Numéro d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 8677

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS VI

par

Jean-Claude AUTRAN

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Les désoxyribonucléoprotéines et les histones du grain de blé. Aspects physico-chimique et physiologique.

Soutenue le 20 Juin 1973 devant la Commission d'Examen

| | |
|---|---|
| M. ULRICH | Président |
| M. GUERN | Examinateurs |
| M. GUITTON | Examinateurs |
| M. BOURDET | Invité |

Numéro d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 8677

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS VI

par

Jean-Claude AUTRAN

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Les désoxyribonucléoprotéines et les histones du grain de blé. Aspects physico-chimique et physiologique.

Soutenue le 20 Juin 1973 devant la Commission d'Examen

| | |
|---|---|
| M. ULRICH | Président |
| M. GUERN | Examinateurs |
| M. GUITTON | Examinateurs |
| M. BOURDET | Invité |

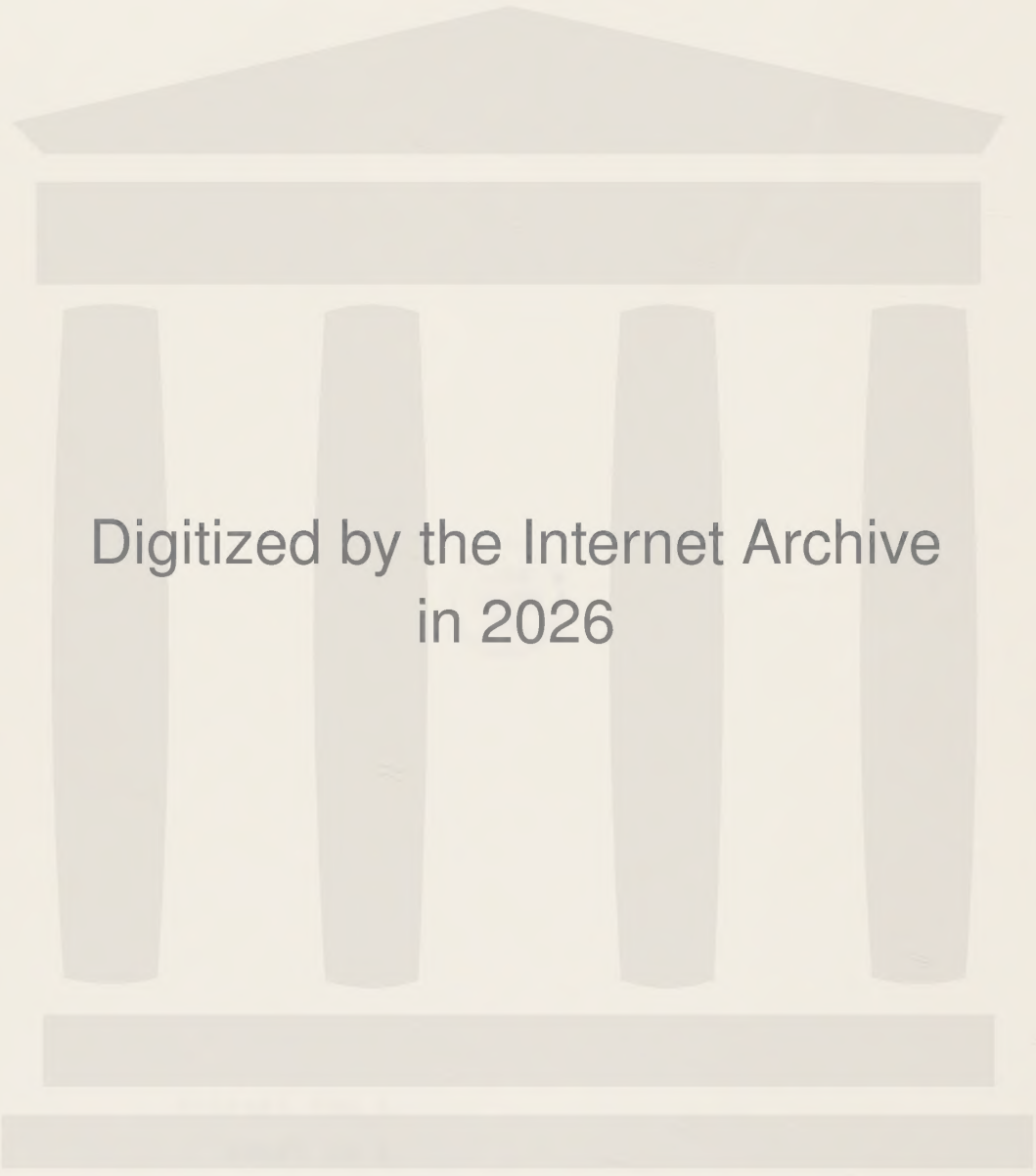
UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes Parents

A ma Femme

A mes fils

en témoignage de mon affection


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548019_0006

# - A V A N T - P R O P O S -

Ce travail a été accompli au Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés de l'Institut National de la Recherche Agronomique, 16 rue Nicolas-Fortin, PARIS 13°.

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer ici mon profond remerciement et ma très grande gratitude à Monsieur Albert BOURDET, Docteur Es-Sciences Physiques, Directeur de Recherches à l'INRA, pour le temps qu'il m'a consacré sans compter et pour les efforts qu'il s'est imposé en vue de me transmettre l'esprit clair et précis de ses propres recherches. Par les conseils les plus attentifs et les enseignements qu'il n'a cessé de me prodiguer, tant pour la conception de l'expérience que pour la rédaction des résultats, je lui dois de m'avoir véritablement initié à la carrière scientifique.

Ma respectueuse reconnaissance va vers Monsieur le Professeur Roger ULRICH, dont j'ai déjà eu le privilège de profiter de l'enseignement qu'il dispense à la Sorbonne, pour la bienveillante confiance qu'il m'a témoignée et le grand honneur qu'il m'a fait d'accepter la présidence de cette thèse.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur Yves GUITTON de l'Université de Perpignan, ainsi que Monsieur le Professeur Jean GUERN de l'Université de PARIS VI, pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu prendre à ce travail et pour avoir accepté d'en être les examinateurs.

C'est avec émotion et reconnaissance que je rendrais hommage à la mémoire de Robert DENAMUR, Directeur de Recherches à l'INRA, dont la très récente disparition n'aura malheureusement pas permis qu'il assiste à la présentation de cette thèse qu'il avait également accepté de juger.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Monsieur André BONASTRE, Directeur de l'ENSIA, à Monsieur le Professeur Jean BURE, ainsi qu'à Monsieur André GUILBOT et à Monsieur Léon PETIT, Directeurs de Recherches à l'INRA, qui ont tous su, lors de ma scolarité à l'ENSIA, guider mes pas d'étudiant vers la carrière de chercheur.

Qu'il me soit permis de dire ma reconnaissance à mes camarades Philippe JOUDRIER, Jacques LEFEBVRE et Daniel RICHARD-MOLARD, Assistants à l'INRA, avec lesquels j'ai toujours pu échanger de fructueuses réflexions.

J'adresse également mes sincères remerciements à Mademoiselle Ginette GOBIN, pour sa collaboration dévouée et la conscience avec laquelle elle s'est toujours acquittée de sa tâche.

Que Madame Aline AUTRAN, mon épouse, ainsi que tous ceux qui, à des titres divers, ont contribué à la réalisation de ce travail, trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.

- TABLE DES MATIERES -


INTRODUCTION ..... page 1

TRAVAUX ANTERIEURS ..... 2

1 - Nature et origine des histones végétales actuellement étudiées ..... 2

2 - Les désoxyribonucléoprotéines (DNP) végétales ..... 4

2.1 - Isolement des noyaux cellulaires ..... 4

2.2 - Isolement de la chromatine ..... 4

2.3 - Extraction directe des DNP à partir des tissus végétaux ..... 5

2.4 - Composition des DNP végétales ..... 5

3 - Les histones végétales ..... 5

3.1 - Isolement de l'histone totale et de ses composants ..... 5

3.2 - Constitution et composition des histones végétales ..... 6

3.3 - Fonctions des histones végétales ..... 7

3.3.1 - Spécificité ..... 7

3.3.2 - Rôle présumé des histones ..... 7

TRAVAUX PERSONNELS ..... 9

1 - Matériel d'étude ..... 10

2 - Méthodes expérimentales ..... 12

2.1 - Préparation des divers matériels étudiés ..... 12

2.1.1 - Germes de blé industriels ..... 12

2.1.2 - Germes de blé obtenus au laboratoire ..... 12

2.1.3 - Embryons de blé ..... 12

2.1.4 - Autres régions du grain de blé ..... 13

2.1.5 - Isolement des noyaux cellulaires de germe et des principaux constituants nucléaires ..... 14

2.2 - Détermination des acides nucléiques ..... 14

2.2.1 - Cas d'un matériel purifié ..... 14

2.2.2 - Cas d'un matériel brut (grain de blé total et tissus du grain ..... 15

2.2.2.1 - Extraction des acides nucléiques par NaCl 1 M, à basse temtérature ..... 15

2.2.2.2 - Détermination par l'intermédiaire des bases puriques ..... 15

2.2.2.3 - Extraction globale par $HClO_4$ à chaud ..... 16

2.2.2.4 - Extraction perchlorique différentielle ..... 16

2.3 - Isolement des différentes protéines étudiées ..... 16

2.3.1 - Isolement des DNP de germe de blé ..... 16

2.3.1.1 - Elimination des RNP et autres protéines cytoplasmiques ..... 16

2.3.1.2 - Extraction des DNP ..... 17

2.3.1.3 - Purification des DNP ..... 17

2.3.2 - Isolement des histones à partir de la DNP purifiée ... 17

2.3.3 - Isolement des protéines du blé définies d'après leurs caractéristiques de solubilité ..... page 18
2.4 - Fractionnement des histones ..... 18
2.4.1 - Fractionnement analytique ..... 18
2.4.1.1 - Electrophorèse en gel d'amidon ..... 18
2.4.1.2 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide ..... 19
2.4.2 - Fractionnement préparatif ..... 21
2.4.2.1 - Précipitation sélective à l'acétone ..... 21
2.4.2.2 - Chromatographie sur colonne de CMC ..... 21
2.4.3 - Isolement des principaux constituants de l'histone ..... 22
2.5 - Méthodes analytiques diverses ..... 23
2.5.1 - Humidité ..... 23
2.5.2 - Azote total ..... 23
2.5.3 - Phosphore total ..... 23
2.5.4 - Protéines ..... 24
2.5.5 - Acides aminés ..... 24
3 - Résultats et discussions 25
1° partie: Etude physico-chimique sur les DNP et les histones du germe de blé ..... 25
3.1 - Les DNP du germe de blé ..... 26
3.1.1 - Etude comparée de diverses méthodes d'isolement des DNP ..... 26
3.1.1.1 - DNP obtenues à partir de préparations de noyaux cellulaires de germe de blé ..... 26
3.1.1.2 - DNP obtenues par extraction directe à partir des germes de blé ..... 27
3.1.2 - Discussions: choix d'une méthode d'isolement des DNP de germe de blé ..... 32
3.1.3 - Caractéristiques physico-chimiques des DNP isolées ..... 33
3.1.3.1 - Evolution de la composition chimique et de la constitution protéique au cours de la purification ..... 33
3.1.3.2 - Composition de la DNP purifiée ..... 36
3.1.3.3 - Caractéristiques de solubilité ..... 37
3.1.3.4 - Essais de fractionnement de la DNP ..... 38
3.1.3.5 - Absorption UV des solutions de DNP ..... 39
3.2 - Les histones du grain de blé ..... 41
3.2.1 - Choix d'une méthode d'isolement des histones du germe de blé ..... 41
3.2.1.1 - Etude comparative de différentes conditions d'extraction en milieu acide ..... 42
3.2.1.2 - Etude comparative de différentes conditions d'isolement des histones à partir de leur solution d'extraction ..... 44
3.2.1.3 - Discussions et justifications de la méthode choisie ..... 45

3.2.2 - Propriétés physico-chimiques de l'histone de germe ... page 46
3.2.2.1 - Aspect, pureté et solubilité ..... 46
3.2.2.2 - Composition en acides aminés ..... 47
3.2.2.3 - Spectre UV de l'histone de germe ..... 47
3.2.2.4 - Détermination quantitative de l'histone par colorimétrie ..... 49
3.2.3 - Les protéines résiduelles de la DNP ..... 50
3.2.4 - Constitution protéique des histones ..... 52
3.2.4.1 - Fractionnement analytique de l'histone ..... 52
a) Electrophorèse en gel d'amidon ..... 52
b) Electrophorèse en gel de polyacrylamide ..... 53
3.2.4.2 - Fractionnement préparatif de l'histone ..... 56
a) Précipitation sélective par l'acétone ..... 57
b) Chromatographie d'échanges d'ions ..... 58
3.2.4.3 - Propriétés physico-chimiques des principaux composants de l'histone de germe ..... 59
a) Constitution électrophorétique ..... 59
b) Composition en acides aminés ..... 60
c) Spectres ultra-violets ..... 62
3.2.5 - Relations entre les histones du germe de blé et les autres histones végétales et animales ..... 62
2° partie: Aspect physiologique de la constitution des histones du grain de blé ..... 67
3.3 - Etude des DNP et des histones de différents tissus du grain ..... 68
3.3.1 - Répartition des composés nucléiques dans le grain ..... 68
3.3.2 - DNP isolées de différents tissus du grain de blé ..... 71
3.3.3 - Les histones de différents tissus du grain de blé ..... 72
3.3.4 - Relations entre les histones et les protéines classiques du blé définies selon les critères de solubilité ..... 75
3.4 - Evolution des histones au cours de la maturation du grain ..... 78
3.4.1 - Résultats expérimentaux ..... 78
3.4.2 - Discussions ..... 79
3.5 - Evolution des histones au cours de la germination ..... 82
3.5.1 - Conditions de germination ..... 82
3.5.1.1 - Cas du grain de blé ..... 82
3.5.1.2 - Cas des embryons isolés ..... 82
3.5.2 - Résultats ..... 83
3.5.2.1 - Histones du grain de blé germé ..... 83
3.5.2.2 - Histones du seul embryon germé ..... 84
3.5.3 - Discussions ..... 84
3.6 - Influence de quelques facteurs externes ..... 87
3.7 - Influence des caractéristiques génétiques ..... 88
3.7.1 - Histones isolées de germes de différents types de blés 88

3.7.1.1 - Variétés de l'espèce T. aestivum ..... page 88
3.7.1.2 - Variétés des espèces T. durum et T. T. compactum ..... 89
3.7.2 - Histones isolées de grains d'Aegilops squarrosa, de seigle et d'orge ..... 89
3.7.3 - Discussions ..... 89
3.8 - Conclusions relatives aux aspects physiologiques de la constitution des histones ..... 92
CONCLUSIONS GENERALES ..... 95
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 99

# INTRODUCTION

Les histones, protéines basiques apparemment associées à l'ADN dans les noyaux cellulaires des organismes eucaryotes, sont supposées jouer un rôle fondamental dans la régulation de l'expression des gènes. Cette conception, émise pour la première fois par STEDMAN et STEDMAN (1950), devait être précisée plus récemment, aussi bien dans le domaine animal que dans le domaine végétal (HUANG et BONNER, 1965; BUTLER et al., 1968; DE LANGE et al., 1969 b; PANYIM et al., 1971).

Actuellement, malgré les innombrables travaux effectués et les nombreuses hypothèses formulées au sujet de la responsabilité des histones dans la répression de l'activité des gènes, ainsi que dans le maintien de l'intégrité structurale de la chromatine, il faut reconnaitre que la fonction précise des différentes histones reste inconnue.

Comme par ailleurs, on possède encore peu d'informations au niveau des organismes autres que les vertébrés, il n'était pas sans intérêt d'entreprendre une étude physico-chimique des désoxyribonucléoprotéines (DNP) et des histones d'un organe végétal tel que le grain de blé.

En effet, le blé lui-même n'a été, de ce point de vue, l'objet d'aucune étude approfondie et, à notre connaissance, aucun travail d'origine française intéressant les histones végétales n'a encore été rapporté.

A cet effet, dans une <u>première partie</u>, nous avons été amenés, en nous appuyant le plus souvent sur des travaux similaires du domaine animal, à examiner comparativement et de façon critique différentes techniques expérimentales déjà éprouvées et à élaborer un protocole d'étude compatible avec la nature très particulière du matériel végétal choisi. Après isolement de DNP et d'histone purifiées à partir du germe de blé, nous avons déterminé quelques unes de leurs caractéristiques physico-chimiques, contribuant ainsi à une meilleure connaissance de ces protéines végétales, puis tenté de dégager des conclusions sur leur originalité par rapport à leurs homologues animales.

Dans une <u>deuxième partie</u>, les observations rassemblées, particulièrement au niveau de la constitution des histones, ont été appliquées à l'étude de certains aspects physiologiques (maturation, germination, facteurs externes, caractéristiques génétiques) relatifs au grain de blé.

Des différents faits mis en évidence, nous nous sommes efforcés de donner un aperçu de l'évolution de ces protéines au cours des transformations physiologiques du grain, de mettre en évidence leur éventuelle variabilité au niveau de quelques espèces et variétés et d'émettre enfin certaines hypothèses quant au rôle biologique possible de leurs principaux composants.

## TRAVAUX ANTERIEURS

La majeure partie des travaux relatifs aux désoxyribonucléoprotéines (DNP) et aux histones concerne le secteur animal et principalement un organe qui constitue un matériel de choix, du fait de sa richesse en composés nucléiques: le thymus de veau. La connaissance des histones végétales ne s'est souvent développée que par analogie avec les travaux du domaine animal, de sorte qu'elle demeure très en retard sur ce dernier. Il suffit de considérer, pour s'en convaincre, que les histones ont été découvertes par KOSSEL en 1884 dans un tissu animal (érythrocytes de poulet) tandis qu'un manuel de biochimie, édité 75 ans plus tard (BISERTE, 1959) signifie encore, dans un chapitre consacré aux histones, qu'on ne possède pas de preuve de leur présence chez les végétaux.

Une étude bibliographique destinée à donner une vue générale des connaissances sur les histones, ne pouvait donc pas se limiter au seul domaine végétal. Du fait de l'abondance des travaux concernant les histones animales dont l'examen apparaissait indispensable au moment d'entreprendre cette étude, nous n'avons exposé ici que les notions relatives aux végétaux en projetant de regrouper l'analyse des principaux travaux sur les histones animales dans un autre document.

### I - NATURE ET ORIGINE DES D.N.P. ET DES HISTONES VEGETALES ACTUELLEMENT ETUDIEES

Presque tous les travaux relatifs aux DNP et aux histones végétales sont postérieurs à 1957 et environ 70 % d'entre eux ont moins de cinq ans. La plupart de ces études semblent avoir été appliquées de préférence à des tissus à métabolisme actif comme des radicules ou des gemmules, au détriment des études sur les tissus de réserve.

Les histones végétales les mieux connues sont certainement celles isolées de la plante de pois et notamment de racines (COHN et QUATRANO, 1965), d'embryons (HUANG et BONNER, 1962; BONNER et HUANG, 1966; DE LANGE et al., 1968, 1969a, 1969b; KONAREV, 1970; MANDAL et al., 1971; SIDOROVA et al., 1971), de gemmules (FAMBROUGH, 1968; FAMBROUGH et BONNER, 1966, 1968, 1969; YAMADA et YASUDA, 1971; SPIKER et CHALKLEY, 1971; LI et BONNER, 1971), de différents tissus (OLIVERA et al., 1964; BONNER et al., 1968; FAMBROUGH et al., 1968).

Les autres végétaux dont, à notre connaissance, les histones ont été étudiées, sont essentiellement: les racines d'Allium cepa (COHN et QUATRANO, 1965;

ZAMPETTI-BOSSELER, 1967; GUBLER et al., 1971), les cellules de Chlorella ellipsoidea (KOBAYASHI et al., 1963; IWAI, 1964), l'endosperme de Cocos nucifera (MANDAL et al., 1971; MONDAL et al.,1970), différents tissus de Lilium longiflorum (SHERIDAN et STERN, 1967), les feuilles et la tige de Nicotiana tabacum (BIRNSTIEL et FLAMM, 1964; NAKAGAKI et HIRAI, 1967; NAZARENKO et LADYGHINA, 1970; SAHAI SRIVASTANA, 1971), les méristèmes de Phaseolus vulgaris (SHERIDAN et STERN, 1967), les racines de Vicia faba (COHN et QUATRANO, 1965; DICK, 1968) et de Trillium grandiflorum (GUBLER et al., 1971).

Les travaux relatifs au domaine particulier des céréales ont été regroupés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Ensemble des travaux relatifs aux histones et nucléohistones de céréales:

| Végétal | Organe | Auteurs |
|---|---|---|
| Hordeum vulgare | Feuilles | SAHAI SRIVASTANA, 1968. |
| Oryza sativa | Embryon | KOBAYASHI et al., 1963, IWAI, 1964. |
| Secale cereale | Radicules | JOHNS et NEIL JONES, 1970; GUBLER et al., 1971. |
| | Plantules | KONAREV et al. 1972. |
| Triticale | Plantules | YAMALEEVA, 1972; YAMALEEVA et al., 1972. |
| Triticum aestivum<br>Triticum durum | Embryons dormants et en germination | GOFSHTEIN, 1968, 1970. |
| | Embryons et plantules | GOFSHTEIN, 1967. |
| | Embryons vernalisés et plantules | TERAOKA, 1967, 1968. |
| | Germes industriels | STEDMAN et STEDMAN, 1951; LIPSHITZ et CHARGAFF, 1956; CRUFT et al., 1957b; JOHNS et BUTLER, 1962b; GOFSHTEIN et al., 1966; AUTRAN et BOURDET, 1970,1971a. |
| | Albumen du grain | AUTRAN et BOURDET, 1970, 1971a. |
| | Plantules | SIDOROVA, 1970; YAMALEEVA, 1970; KONAREV et al., 1972; SKAKHOV et KUZNETSOV, 1972; YAMALEEVA et al., 1972. |
| Zea Mays | Coléoptiles | BEX, 1972. |

En marge de ces travaux, il convient de citer certains de ceux qui ont soupçonné ou même identifié la présence d'histone ou de désoxyribonucléoprotéine dans du matériel végétal, sans avoir procédé à une étude biochimique plus approfondie. C'est le cas de ÄYRÄPÄÄ (1957) pour les extraits salins d'orge, de BOURDET et FEILLET (1967) pour les globulines de farine de blé et de KONDO et MORITA (1954) pour la gluténiné de riz.

Enfin, les histones végétales ont pu être l'objet d'autres travaux dans une optique qui n'est pas la nôtre, tels ceux de HIMES (1967) sur les racines de maïs, de KIRK et NEIL JONES (1970) sur le seigle, de BHATTACHARYA et al. (1965) sur les feuilles de blé, de AVETISOVA (1970) sur les plantules d'élodée et de INNOCENTI (1971) sur les méristèmes de racines de blé dur, dans lesquels il n'est fait mention que de techniques cytochimiques ou microscopiques sans étude biochimique.

## 2 - LES DESOXYRIBONUCLEOPROTEINES VEGETALES

L'obtention des DNP a été réalisée soit par isolement préalable des noyaux cellulaires ou de la chromatine, notamment chez les organes végétaux à métabolisme actif, soit par extraction directe sur la base des seules propriétés de solubilité, particulièrement chez les organes de réserve.

### 2.1 - ISOLEMENT DES NOYAUX CELLULAIRES

L'isolement de noyaux cellulaires de végétaux, avec un rendement non négligeable, est toujours gêné par la présence des membranes cellulosiques. Plusieurs auteurs ont cependant réalisé l'opération par centrifugation différentielle en milieu de densité élevée (SHERIDAN et STERN, 1967; GOFSHTEIN, 1967, 1968; VASIL'EVA, 1969) et parfois en présence d'hémicellulase (ZAMPETTI-BOSSELER, 1967) ou encore d'octanol et de chlorox (NAKAGAKI et HIRAI, 1967; DICK, 1968) afin de réduire les contaminations cytoplasmiques.

### 2.2 - ISOLEMENT DE LA CHROMATINE

Ce procédé a été mis en oeuvre uniquement à partir de tissus à métabolisme intense, notamment selon la technique élaborée initialement par HUANG et BONNER (1962) et BONNER et al., (1968). Il intervient toujours une homogénéisation dans un milieu tamponné assurant l'intégrité du matériel nucléaire, une filtration pour retenir les débris cellulaires et des lavages pour éliminer le matériel cytoplasmique. La chromatine brute ainsi obtenue peut être purifiée par ultracentrifugation puis utilisée soit pour extraire la DNP à l'aide de NaCl concentré (SPELSBERG et SARKISSIAN, 1968; SAHAI SRIVASTANA, 1971) ou d'eau pure (BONNER et HUANG, 1963), soit pour isoler directement l'histone (MANDAL et al., 1971; SPIKER et CHALKLEY, 1971; BEX, 1972).

### 2.3 - EXTRACTION DIRECTE DES D.N.P. A PARTIR DES TISSUS VEGETAUX

Dès 1951, STEDMAN et STEDMAN ont rapporté l'impossibilité d'obtenir des préparations satisfaisantes de noyaux cellulaires de germe de blé à l'aide des techniques classiques et ont souligné la nécessité d'isoler les DNP sur la base de leurs propriétés de solubilité en milieu salin concentré après élimination des ribonucléoprotéines et autres protéines cytoplasmiques à l'aide de solutions isotoniques (NaCl 0,14 M) dans lesquelles les DNP sont insolubles, selon l'idée de MIRSKY et POLLISTER (1942, 1946).

Tous les travaux relatifs aux tissus végétaux à métabolisme ralenti à l'exception de ceux de GOFSHTEIN (1967, 1968), ont utilisé ce principe, du fait de la difficulté d'isoler des constituants nucléaires ou de la faiblesse des rendements obtenus. C'est le cas de LIPSHITZ et CHARGAFF (1956), CRUFT et al. (1957b), JOHNS et BUTLER (1962b); GOFSHTEIN et al. (1966) pour les germes de blés industriels, ainsi que de TERAOKA (1967, 1968) pour l'embryon de blé, de KOBAYASHI et al. (1963), IWAI (1964) pour l'embryon de riz. C'est également notre cas dans les études préliminaires à ce travail (AUTRAN et BOURDET, 1970, 1971a).

### 2.4 - COMPOSITION DES D.N.P. VEGETALES

Peu de travaux ont abordé l'aspect quantitatif de la composition des DNP. Quelques résultats concernant l'embryon et la gemmule de pois (BONNER et HUANG, 1963; SPIKER et CHALKLEY, 1971), la plante de tabac (SAHAI SRIVASTANA, 1971) et la feuille d'orge (SAHAI SRIVASTANA, 1968), font cependant état de DNP contenant 36 à 46 % d'ADN, 35 à 55 % d'histone et 7 à 20 % de protéine "non histone" ou"résiduelle". Le rapport histone/ADN, qui est souvent voisin de 1,0 à 1,2 et surtout le rapport non-histone/histone, sont susceptibles de varier significativement entre les différents organes d'un même végétal ainsi qu'au cours du vieillissement des tissus.

## 3 - LES HISTONES VEGETALES

### 3.1 - ISOLEMENT DE L'HISTONE TOTALE ET DE SES COMPOSANTS

Selon la plupart des travaux, l'histone totale est extraite des divers matériels nucléaires (noyaux, chromatine ou DNP) par action d'un acide fort (HCl ou $H_2SO_4$; 0,1 N à 0,5 N) puis recueillie soit après précipitation par l'éthanol ou l'acétone, soit après dialyse et lyophilisation.

Les méthodes classiques de fractionnement ont mis en évidence l'hétérogénéité des histones: leurs composants sont désignés au moyen de deux types de nomenclatures: celle de JOHNS, dite nomenclature F, fondée sur la chromatographie sur CMcellulose (JOHNS et al., 1960) et celle de LUCK, dite nomenclature romaine, fondée sur la chromatographie sur Amberlite IRC 50 (LUCK et al., 1958; RASMUSSEN et al., 1962). Dans le cas du pois, la désignation des 5 fractions principales est la suivante: $F_1$ (I),

$F_2a_1$ (IV), $F_2a_2$ (IIb), $F_2b$ (IIa), $F_3$ (III).

Quelques travaux rapportent l'isolement préparatif des composants de l'histone. Par extraction sélective à partir de la DNP, on peut citer ceux de DICK (1966), SHERIDAN et STERN (1967), SPELSBERG et SARKISSIAN (1968) et MANDAL et al. (1971). Par précipitation sélective, on connait ceux de STEDMAN et STEDMAN (1951), JOHNS et BUTLER (1962b) et GOFSHTEIN (1968). Enfin, KOBAYASHI et al. (1963), IWAI (1964) et SAHAI SRIVASTANA (1971) font état de chromatographie sur CMcellulose selon JOHNS et al. (1960), tandis que FAMBROUGH et BONNER (1966, 1968, 1969) préconisent le système de LUCK et al. (1958) ainsi que le tamisage moléculaire dans Bio-Gel P 60.

## 3.2 - CONSTITUTION ET COMPOSITION DES HISTONES VEGETALES

L'électrophorèse a été très couramment utilisée pour réaliser des fractionnements analytiques. A l'exception des travaux historiques de CRUFT et al. (1957a, b) qui opèrent en milieu liquide et de ceux rapportés par JOHNS et BUTLER (1962b) et AUTRAN et BOURDET (1970), en gel d'amidon, c'est le gel de polyacrylamide qui est le plus employé.

Les différents auteurs n'utilisent qu'un nombre restreint de techniques classiques, notamment celle de REISFELD et al. (1962) (FAMBROUGH et BONNER, 1966, 1968, 1969; JOHNS et NEIL JONES, 1970; MANDAL et al., 1971), celle de Mc ALLISTER et al. (1963) (TERAOKA, 1967, 1968; SHERIDAN et STERN, 1967; GOFSHTEIN, 1967, 1968) et celle de PANYIM et CHALKLEY (1969) (AUTRAN et BOURDET, 1971a; YAMALEEVA, 1970; YAMALEEVA et al., 1972). Ces procédés sont cependant relativement voisins, notamment pour les conditions de pH acide (2,9 à 4,3) et de teneur élevée en acrylamide (15 à 18 %) qu'ils impliquent. En outre, les techniques initialement décrites ont été généralement modifiées par incorporation d'urée 6 M ou 8 M aux gels.

Dans ces conditions, les histones végétales étudiées apparaissent presque toujours constituées d'un petit nombre de composants électrophorétiques (6 à 8), tout comme les histones animales, les diagrammes observés étant souvent comparables.

Enfin un seul travail, à notre connaissance, utilise l'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide (FAMBROUGH et BONNER, 1969) tandis que quelques auteurs font état d'analyses immunologiques des fractions d'histones en gel d'agar. Cependant, si KONAREV (1970), SIDOROVA et al. (1971) et YAMALEEVA (1971) observent une forte activité antigénique des histones végétales, MANDAL et al. (1971) ne leur découvrent qu'un caractère antigénique faible.

Par ailleurs, les histones végétales apparaissent dans l'ensemble, comme leurs homologues animales, très riches en acides aminés basiques (23 à 25 % des acides aminés totaux) avec un rapport lysine/arginine voisin de 2,0 à 2,4 et dépourvues d'acides aminés soufrés (DICK, 1968; JOHNS et BUTLER, 1962b; SHERIDAN et STERN 1967; ZAMPETTI-BOSSELER, 1967).

Il existe ainsi de profondes analogies de composition entre les fractions riches en arginine du type $F_3$ ou $F_2a_1$ du pois et du thymus de veau (FAMBROUGH et BONNER, 1966, 1968, 1969). Cependant, dans le cas de l'embryon de blé ou de riz, on n'a pas isolé de fractions exactement assimilables à celles des histones animales (CRUFT et al., 1957b; IWAI, 1964), ce que JOHNS et BUTLER (1962b) ont confirmé en étudiant les acides aminés N-terminaux.

L'analogie entre les histones animales et végétales a pu cependant, dans l'ensemble, être confirmée et étendue à la suite des remarquables travaux de DE LANGE et al. (1968, 1969a, b) qui ont abouti à la détermination complète de la séquence de l'histone IV (ou $F_2a_1$) chez le thymus de veau et l'embryon de pois: les différences entre les deux séquences ne concernent ainsi que trois acides aminés sur les 102 que comporte la protéine.

Par ailleurs, des observations du même ordre semblent se dégager (FAMBROUGH et BONNER, 1968; DE LANGE et al.,1972) au niveau des histones III ($F_3$) elles-mêmes, ce qui permet actuellement de penser que les deux types d'histones riches en arginine sont sous la dépendance de gènes essentiels dont la conservation a été assurée au cours de l'évolution des espèces.

## 3.3 - FONCTIONS DES HISTONES VEGETALES

### 3.3.1 - Spécificité:

Si des premiers travaux avaient cru mettre en évidence une certaine spécificité, les études récentes, particulièrement celles rapportées par les équipes de BONNER et de PANYIM, tendent à démontrer, au contraire, la faible variabilité des histones.

Les fractions les plus riches en arginine apparaitraient pratiquement identiques entre des organismes différents. Celles riches en lysine, seraient en revanche, plus spécifiques, leur constitution caractérisant des familles, des genres ou même des espèces.

Au niveau des différents organes d'un même végétal, on peut observer également quelques différences, mais uniquement dans les proportions relatives des différents composants, sans modification qualitative des diagrammes électrophorétiques (FAMBROUGH et al., 1968).

### 3.3.2 - Rôle présumé des histones:

Les récents travaux sur les histones végétales ont permis d'élargir considérablement le champ des organismes vivants étudiés et de vérifier ainsi que les découvertes effectuées au niveau de quelques vertébrés, pouvaient être étendues à des êtres beaucoup plus éloignés génétiquement.

On pense donc, depuis peu, que les fractions les plus riches en arginine ($F_3$ et surtout $F_2a_1$) qui apparaissent constantes, même au niveau de leur structure primaire, entre des organismes aussi éloignés que le veau et le pois, pourraient avoir un rôle essentiellement structural dans la DNP. Ce rôle d'agent répresseur définitif et hautement spécifique de la structure de l'ADN, dans les cellules différenciées, se traduisant par un blocage de la transcription de certaines séquences en ARN messager, sans supprimer la possibilité d'une réplication, constituerait la seule explication compatible avec un tel degré de conservation au cours de l'évolution (DE LANGE et al., 1969b).

Les autres fractions, notamment la plus riche en lysine, $F_1$, dont on sait qu'elle ne donne pas de complexe très stable avec l'ADN et dont la constitution varie nettement d'un organisme à l'autre, sont supposées beaucoup plus aptes à réaliser, non pas un blocage définitif des gènes, mais une répression réversible pouvant être modifiée selon les conditions.

Par ailleurs, les travaux sur les végétaux de HUANG et BONNER (1962, 1965) ont permis d'aborder l'explication du phénomène de reconnaissance des sites de l'ADN par l'isolement d'un ARN intermédiaire, spécifique de certaines séquences de l'ADN. Cela semble la seule possibilité rendant plausible le rôle d'outil de la régulation de milliers de gènes par un nombre très restreint, une dizaine environ, d'espèces moléculaires histones différentes.

## TRAVAUX PERSONNELS

L'analyse bibliographique précédente montre combien les connaissances sur les histones végétales sont encore fragmentaires et nettement en retard sur celles de leurs homologues animales. Cela explique qu'à de nombreuses occasions, nous ayons été contraints de nous rapporter à des travaux originaires du secteur animal, faute de résultats équivalents au niveau des végétaux et surtout des graines de céréales.

Après avoir défini le matériel d'étude et les méthodes expérimentales, nos résultats sont présentés et discutés selon le plan suivant:

Une première partie est consacrée à l'étude physico-chimique des DNP et des histones du germe de blé. Une étude comparée de diverses méthodes d'isolement aboutit ainsi au choix d'un protocole fondé sur les propriétés de solubilité, permettant la préparation de désoxyribonucléoprotéines (DNP) après élimination des ribonucléoprotéines (RNP). Quelques propriétés physico-chimiques des DNP purifiées (composition nucléique et protéique, fractionnement, spectre UV) sont alors mises en évidence.

A partir des DNP on procède ensuite à l'isolement des protéines du type histone, apparemment associées à l'ADN avec d'autres fractions dites résiduelles. Certaines caractéristiques physico-chimiques des histones ainsi obtenues (solubilité, spectre UV, composition en acides aminés, constitution protéique après fractionnements analytiques et préparatifs), sont déterminées.

L'isolement à l'état pur des principaux composants de l'histone du germe de blé permet enfin de préciser son originalité de constitution comparativement à diverses protéines homologues animales et végétales.

Dans une deuxième partie, les observations ainsi rassemblées, en particulier au niveau de la constitution protéique des histones, sont appliquées à l'étude de quelques problèmes de nature essentiellement physiologique:

D'une part, l'isolement de DNP et d'histones à partir de différents tissus du grain de blé permet d'établir des relations entre les histones elles-mêmes et les protéines de types globulines et gluténines, constitutives de ces mêmes tissus.

D'autre part, l'influence des phénomènes de maturation et de germination du grain, des facteurs externes (lieu de culture, fertilisation) et des caractéristiques génétiques, sur la constitution des histones, ce qui conduit à formuler certaines hypothèses quant au rôle biologique de leurs principaux composants.

## 1 - MATERIEL D'ETUDE

Les histones et les autres protéines dont il est fait état ont été le plus souvent isolées du germe de blé. Dans certains cas et à titre de comparaison, ces protéines ont été obtenues à partir du grain entier ou de certains produits de sa mouture semi-industrielle, grossièrement assimilables à des régions histologiques.

Dans l'ensemble, le choix des échantillons a été guidé par la nature des facteurs étudiés. Cependant, les quantités importantes de matériel nécessitées pour isoler les histones ont constitué un facteur limitant parmi les variétés de blés disponibles. Pour obtenir quelques milligrammes d'histone pure, il faut, en effet, disposer de 3 à 5 grammes de germes ou bien de 30 grammes de grains. Ces impératifs excluent donc, d'une part, la préparation des différents matériels par dissection manuelle, d'autre part, le choix de la plupart des progéniteurs des variétés actuelles, disponibles seulement en collection et en très faible quantité.

Nous avons donc retenu des blés relativement communs (espèces aestivum, durum et compactum du genre Triticum), mais constituant une gamme aussi large que possible, tant sur le plan technologique que génétique. A titre de comparaison, nous avons également isolé les histones de deux autres céréales: seigle et orge.

Nous proposant de détailler davantage les caractéristiques des échantillons utilisés au cours des différents chapitres, nous nous limiterons à un tableau indiquant leur nature et leur origine ainsi que les facteurs qu'ils ont permis d'étudier (tableau 2).

Le matériel a été conservé au froid, tout particulièrement les germes frais (non délipidés), afin de retarder leur modification au cours du vieillissement.

Tableau 2 : Liste et caractéristiques des échantillons utilisés :

| Origine ou variétés | Nombre | Nature | Caractéristiques générales | Facteurs étudiés |
|---|---|---|---|---|
| France | 1 | Germes de blés industriels | Très purifiés mais provenant d'un mélange de variétés | - Mise au point des méthodes expérimentales<br>- Fractionnements préparatifs |
| France | 24 | Germes (moulin de laboratoire) | 20 T. aestivum; 4 T. durum | Différenciation génétique |
| U.S.A. | 10 | | 7 T. aestivum; 2 T. durum; 1 T. compactum | |
| Aegilops squarrosa | 1 | Grains non décortiqués | Genre diploïde détenteur du génôme D | |
| France | 11 | Germes (moulin de laboratoire) | 4 variétés avec différents lieux de culture et apports d'azote | Facteurs externes |
| INRA 62-15 | 11 | Grains | 1 blé tendre avec 11 prélèvements au cours de la maturation | Evolution des histones au cours de la maturation |
| Cappelle; Etoile de Choisy | 10 | Produits de la mouture semi-industrielle du grain de blé | Pour chaque variété: farine, sons, remoulages et grain entier | Comparaison des DNP et histones de différents tissus du grain |
| Cappelle | 6 | Grains | Blé à différents stades de la germination | Evolution au cours de la germination |
| Atys | 5 | | Embryon isolé, à différents stades de la germination | |

## 2 - METHODES EXPERIMENTALES

### 2.1 - PREPARATION DES DIFFERENTS MATERIELS ETUDIES

#### 2.1.1 - Germes de blé industriels:

La mise au point de la plupart des méthodes expérimentales a été faite sur des germes industriels (1) obtenus à partir de lots de blés commerciaux.

Ce matériel est obtenu comme suit:

- écrasement du grain (cylindres cannelés)
- récupération de fractions moyennes par tamisage (entre 22 et 34 mesh)
- aplatissement de ces "grosses semoules" (cylindres lisses)
- récupération des plaquettes de germe par tamisage (refus de 16-18 mesh

Les germes ainsi obtenus sont ensuite partiellement délipidés par épuisement à l'éther de pétrole, à température ordinaire, opération qui permet également d'éliminer par décantation la plupart des impuretés.

#### 2.1.2 - Germes de blés obtenus au laboratoire:

En vue de l'étude des histones provenant de variétés différentes, nous avons été conduits à isoler des préparations de germes à partir de variétés définies.

Le principe de l'opération reste le même que celui de l'isolement industriel, mais se situe à l'échelle du laboratoire (moulin expérimental SOCAM) et avec des opérations manuelles (2).

2 Kg de grains permettent d'isoler, selon les variétés, 5 à 20 g de germes de pureté satisfaisante.

#### 2.1.3 - Embryons de blé:

L'isolement industriel aboutit à des germes aplatis, non viables, où embryon et scutellum restent mal différenciés. Faute de ne pouvoir réaliser des dissections manuelles du grain en raison de la quantité de matériel à traiter (minimum 3000 grains), nous avons eu recours à une technique rapide, inspirée de celle de

---

(1) Nous sommes heureux de remercier ici M. COLAS, des Grands Moulins de Paris, qui a bien voulu nous fournir ce matériel dans les meilleures conditions.

(2) Nous remercions ici MM. PILON et WILLM, professeurs à l'E.N.S.M.I.C., d'avoir bien voulu nous guider dans la réalisation de ce travail et mettre à notre disposition tout l'appareillage nécessaire.

JOHNSTON et STERN (1957).

Ce procédé, qui permet d'obtenir en quantités élevées (plusieurs dizaines de grammes par jour) des préparations d'embryons très purs et viables, grâce à une différence de densité des diverses régions du grain, peut être schématisée comme suit:

- concassage rapide du grain (5 secondes) avec un simple moulin à café.
- séparation des particules obtenues à l'aide de 3 tamis de calibre 10, 16 et 28.
- recyclages des refus de 10, élimination des particules de taille comprise entre 16 et 28, conservation du refus de 28.
- élimination des enveloppes du grain, à l'aide d'un courant d'air (ventilation).
- purification du produit: conservation des seules fractions situées entre 18 et 24.
- séparation des embryons par mise en suspension dans un mélange de densité 1,325 (cyclohexane - tétrachlorure de carbone: 10:25 (V/V). Les embryons y flottent tandis que les autres particules sédimentent. La séparation est parfaite si l'élimination préalable des enveloppes est totale. Les embryons sont recueillis à la surface et étalés sur un papier filtre jusqu'à évaporation des solvants.

2.1.4 - Autres régions du grain de blé:

Dans l'impossibilité d'opérer des isolements manuels, nous avons eu recours à des produits de la mouture semi-industrielle du grain correspondant grossièrement à des régions histologiques.

Le diagramme du moulin utilisé a permis de séparer, sur la base de la dimension des particules, les quatre fractions suivantes:

- la farine (78,3 % du grain), représentative de l'albumen.
- les "remoulages blancs" (1,6 %), riches en fractions périphériques et en parois cellulosiques des cellules de l'albumen.
- les "remoulages bis" (5,8 %), qui contiennent des fragments d'assise protéique et d'enveloppes.
- les "gros sons", correspondant essentiellement aux enveloppes externes, auxquelles d'autres couches cellulaires (assise protéique) restent partiellement attachées (14,3 %).

Selon ce diagramme, les germes ne sont pas isolés mais se retrouvent au niveau des deux types de remoulages.

2.1.5 - Isolement des noyaux cellulaires de germe et des principaux constituants nucléaires:

La méthode utilisée dérive de celle de VASIL'EVA et al. (1969) dont le principe est fondé sur la centrifugation différentielle dans un milieu de densité élevée.

20 grammes de germes sont dispersés à basse température, durant 30 secondes, à l'aide de l'appareil Ultra-Turrax (TP 18/2 - 24.000 t/mn) dans 200 ml de glycérol 40 % amené à pH 6,8 par du phosphate disodique.

Après repos de 2 heures au froid, la suspension est filtrée plusieurs fois au travers d'une mousseline afin d'éliminer les plus gros débris cellulaires, puis centrifugée 5 mn à 60 g au froid. Le surnageant est ensuite centrifugé 10 mn à 300 g, ce qui entraine la sédimentation des noyaux.

Il est également possible de remplacer le glycérol 40 % par du saccharose 2 M (BOULTER et al., 1965) en opérant à 40.000 g. Une purification des noyaux centrifugés est alors possible en milieu saccharose 2,62 M dans lequel les noyaux surnagent à 40.000 g (selon le principe de CHAUVEAU et al., 1956).

Les différentes protéines constitutives des noyaux cellulaires sont obtenues par extractions sélectives, respectivement au moyen de NaCl 0,14 M (globulines et ribosomes nucléaires), NaCl 1 M (DNP), NaOH 0,1 N (protéines acides de la chromatine), selon le schéma présenté sur la figure 1. Les DNP elles-mêmes sont précipitées par dilution à concentration finale 0,14 M et les histones sont extraites du précipité DNP par simple traitement acide.

## 2.2 - DETERMINATION DES ACIDES NUCLEIQUES

### 2.2.1 - Cas d'un matériel purifié:

A partir des nucléoprotéines purifiées ou des préparations protéiques isolées, la détermination des acides nucléiques est réalisée dans les conditions suivantes:

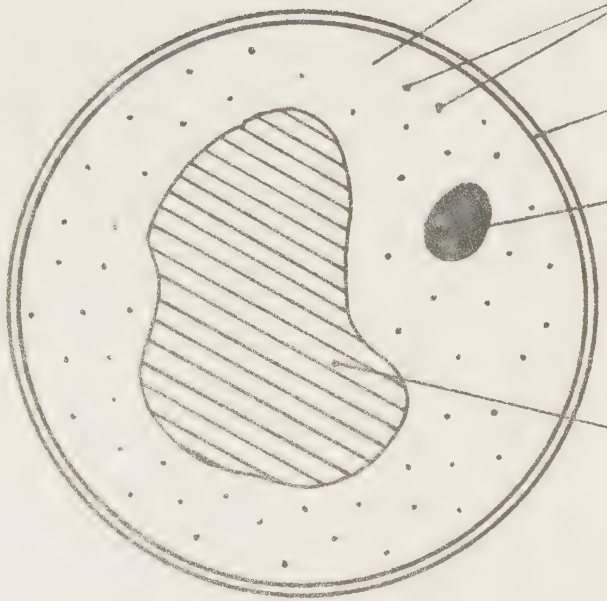
- Extraction de l'ARN et de l'ADN sur 50 à 100 mg de matériel, par 3 traitements à 90°C au moyen de $HClO_4$ 0,5 N.

- Dosage des acides nucléiques totaux par spectrophotométrie UV et colorimétrie de l'ADN par la diphénylamine-acétaldéhyde (BURTON, 1956). L'ARN est estimé par différence.

- Dans le cas de préparations très purifiées (débarrassées notamment de pentosanes), l'ARN peut être dosé spécifiquement selon la réaction à l'orcine (MEJBAUM, 1939).

# SCHEMA D'UN NOYAU CELLULAIRE

## CARACTERISTIQUES DE SOLUBILITE DE SES CONSTITUANTS



Suc nucléaire (globulines nucléaires)

Ribosomes nucléaires

} Extrait par Na Cl 0,14 M.

Membrane nucléaire : insol. Na OH 0,1 N

Nucléole : protéines sol. Na OH 0,1 N

Chromatine { Une fraction protéique de la chromatine : sol. Na OH 0,1 N

DNP { Histones : sol. HCl 0,25 N

Protéine résiduelle insol. HCl 0,25 N

A D N : insol. HCl 0,25 N

} Extrait par Na Cl 1M

} Insoluble dans Na Cl 1M

Figure 1

2 2 2 - Cas d'un matériel brut (grain de blé total et tissus du grain):

Quatre procédés distincts ont été retenus. Dans tous les cas, les opérations font intervenir successivement une préparation des tissus, une extraction des acides nucléiques et un dosage proprement dit.

La phase de préparation commune à tous les procédés comprend:

- un broyage (broyeur à marteaux).
- une délipidation (3 extractions successives par l'éthanol-éther (1/3) à 75° C.
- une élimination des composés acido-solubles à froid (notamment des nucléotides) par 3 extractions successives à l'acide perchlorique 0,25 N à 0° C.

Les conditions d'extraction et de dosage sont détaillées pour chacun des 4 modes opératoires suivants, utilisés parallèlement.

2.2.2.1 - Extraction des acides nucléiques par NaCl 1 M, à basse température:

Une dispersion durant une minute, à l'aide de l'appareil Ultra-Turrax, de 5 grammes de tissu dans NaCl 1 M, permet de solubiliser la quasi totalité des acides nucléiques (sous forme de nucléoprotéines, partiellement dissociées).

L'extrait obtenu, réuni à 2 lavages du résidu, est soumis à une dialyse contre l'eau, puis lyophilisé.

L'analyse nucléique des produits lyophilisés devient alors possible par simple hydrolyse perchlorique à 90° C. L'ADN est dosé selon BURTON (1956); les acides nucléiques totaux sont déterminés par lecture spectrophotométrique à 260-265 nm, grâce à une courbe d'étalonnage; l'ARN est estimé par différence.

Les résultats sont rapportés au tissu initial sur la base de l'azote non dialysable extrait par NaCl 1 M.

2.2.2.2 - Détermination par l'intermédiaire des bases puriques (NETUPSKAYA et al., 1959):

On procède à une hydrolyse prolongée de 1 g de tissu par $H_2SO_4$ 1 N, ce qui amène une séparation des seuls nucléotides puriques. Ceux-ci sont précipités sélectivement par addition de nitrate d'argent 0,5 M puis solubilisés dans HCl 1 N.

La solution obtenue, dont le spectre UV n'apparait pas contaminé, permet une détermination spectrophotométrique en se rapportant à une courbe d'étalonnage.

2.2.2.3 - Extraction globale par l'acide perchlorique à chaud (SCHNEIDER et al., 1950):

A partir de 1 g de tissu, on procède à 3 extractions successives par $HClO_4$ 0,5 N à 90° C. Pour la plupart des matériels étudiés, seul le dosage de l'ADN apparait possible sur cet extrait global (BURTON, 1956).

Dans le cas du germe, il est cependant possible de doser les acides nucléiques totaux par spectrophotométrie et de connaitre ainsi l'ARN par différence.

2.2.2.4 - Extraction perchlorique différentielle selon OGUR et ROSEN (1950):

Trois extractions prolongées par $HClO_4$ 1 N, au froid, permettent de solubiliser la majeure partie de l'ARN sans entraîner d'ADN. Trois autres traitements par $HClO_4$ 0,5 N à 90° C permettent alors d'obtenir l'ADN (et éventuellement l'ARN résiduel).

Les extraits à froid, peu contaminés, permettent l'estimation de l'ARN par spectrophotométrie UV, ou par dosage du phosphore nucléique. On peut également doser l'ADN, selon BURTON (1956) dans les extraits à chaud.

La fraction d'ARN non extraite à froid est généralement inférieure à 10 %, ce qui permet de fixer un ordre de grandeur acceptable, chez les tissus dont l'étude s'avère délicate.

## 2.3 - ISOLEMENT DES DIFFERENTES PROTEINES ETUDIEES

Pour la description des protocoles expérimentaux ci-dessous, nous nous sommes limités au cas du germe de blé comme matériel de base. L'application aux autres tissus du grain est possible en modifiant prises d'essais et volumes de solvants, compte tenu des teneurs plus ou moins élevées en composés nucléiques de chacun des produits étudiés.

### 2.3.1 - Isolement des DNP de germe de blé:

2.3.1.1 - Elimination des RNP et autres protéines cytoplasmiques:

Toutes les opérations décrites ci-dessous (extractions, centrifugations) sont réalisées au froid.

100 g (substance sèche) de germes industriels partiellement délipidés sont mis en suspension dans 700 ml de solution saline physiologique (NaCl 0,14M) amenée à pH 7 par du phosphate disodique. On soumet alors la suspension à une dispersion au moyen de l'appareil Ultra-Turrax (24.000 t/mn) durant 1 mn, ce qui assure la

pulvérisation des germes en milieu liquide et au froid.

Après un repos d'une heure, la suspension est centrifugée 15 mn à 3.300 t/mn (3.000 g). Le surnageant contenant ribonucléoprotéines, protéines cytoplasmiques et diverses impuretés est éliminé. Le culot est remis en suspension manuellement dans 700 ml de NaCl 0,14 M puis centrifugé dans les mêmes conditions. L'opération de lavage est ainsi répétée au moins 6 fois, jusqu'à l'obtention d'un surnageant limpide.

2.3.1.2 - Extraction des DNP:

Le résidu lavé par NaCl 0,14 M est remis en suspension manuellement dans 300 ml de NaCl 1 M ajusté à pH 6, puis soumis à une dispersion durant 30 secondes à l'Ultra-Turrax.

Après une heure de repos au froid, la suspension est centrifugée 15 mn à 3.300 t/mn. On recueille l'extrait et on lave le culot deux fois par 100 ml de NaCl 1 M. La réunion de l'extrait et des lavages constitue l'extrait brut de DNP.

2.3.1.3 - Purification des DNP:

On procède à une nouvelle centrifugation de l'extrait brut total durant 30 mn à 18.000 t/mn (40.000 g) afin d'éliminer préalablement des impuretés mal solubilisées.

Les DNP sont alors précipitées de leur solution par dilution jusqu'à concentration finale 0,14 M NaCl (par addition de 6 volumes d'eau, soit environ 3.000 ml). Le précipité de DNP est récupéré par centrifugation à 3.300 t/mn.

On procède alors à la redissolution de ce précipité fibreux dans 100 ml de NaCl 1 M par agitation magnétique durant une nuit. La solution visqueuse obtenue est ensuite centrifugée 30 mn à 18.000 t/mn afin d'éliminer les éventuelles fractions insolubles.

Ce cycle de précipitations et de redissolutions est répété en éliminant toujours les fractions solubles en milieu 0,14 M et insolubles en milieu 1 M. Quatre ou cinq opérations successives sont généralement nécessaires pour obtenir une préparation entièrement soluble dans NaCl 1 M et totalement précipitable dans NaCl 0,14 M. Le dernier précipité (DNP purifiée) peut être, soit lyophilisé tel quel, soit utilisé sur-le-champ pour l'extraction des histones.

2.3.2 - Isolement des histones à partir de la DNP purifiée:

On traite environ 1 gramme de DNP fraiche ou lyophilisée par 50 ml d'acide (HCl 0,25 N ou $H_2SO_4$ 0,25 N), soit par dispersion durant 15 secondes à l'Ultra-Turrax, soit par agitation magnétique durant 2 heures. La suspension obtenue est cen-

trifugée 10 mn à 18.000 t/mn et le résidu est lavé deux fois par 25 ml du même acide. La réunion de l'extrait et des 2 lavages constitue la solution acide d'histone totale.

Dans le cas d'une extraction par HCl, la solution est dialysée 2 jours au froid contre HCl 0,001 N, pH 3, fréquemment renouvelé, puis lyophilisée directement. Dans le cas d'une extraction par $H_2SO_4$, l'histone est précipitée de sa solution par addition de 3 volumes d'éthanol et séjour 36 h à - 20° C. Le précipité, centrifugé, est lavé 1 fois par l'éthanol et 2 fois par l'acétone (ou l'éther) puis exposé à l'air libre jusqu'à évaporation totale du solvant. La figure 2 donne le schéma de l'ensemble des opérations d'isolement de l'histone.

2 3.3 - Isolement des protéines du blé définies d'après leurs caractéristiques de solubilité:

Le mode opératoire suivi utilise le principe d'OSBORNE (1907) précisé par FEILLET (1965). En voici le schéma:

- Extraction des "protéines solubles" (albumines et globulines) par NaCl 0,5 M, pH 6,8. Séparation des albumines hydrosolubles, des globulines, hydro-insolubles, par dialyse contre l'eau.
- Extraction des gliadines par l'éthanol 70 %.
- Extraction des gluténines par la glycol monochlorhydrine à 70 %, pH 2,3.

Tous les extraits sont soumis à une dialyse prolongée contre l'eau, puis lyophilisés et conservés à l'état sec.

## 2.4.- FRACTIONNEMENT DES HISTONES

### 2.4.1 - Fractionnement analytique:

#### 2.4.1.1 - Electrophorèse en gel d'amidon:

a) Matériel:

- Générateurs de tension CNRA (0-200 mA; 0-750 volts)
- Cuves PLEUGER décrites par FEILLET (1965) permettant d'opérer avec des gels de 32 x 24 cm et de 6 mm d'épaisseur.

b) Nature des tampons:

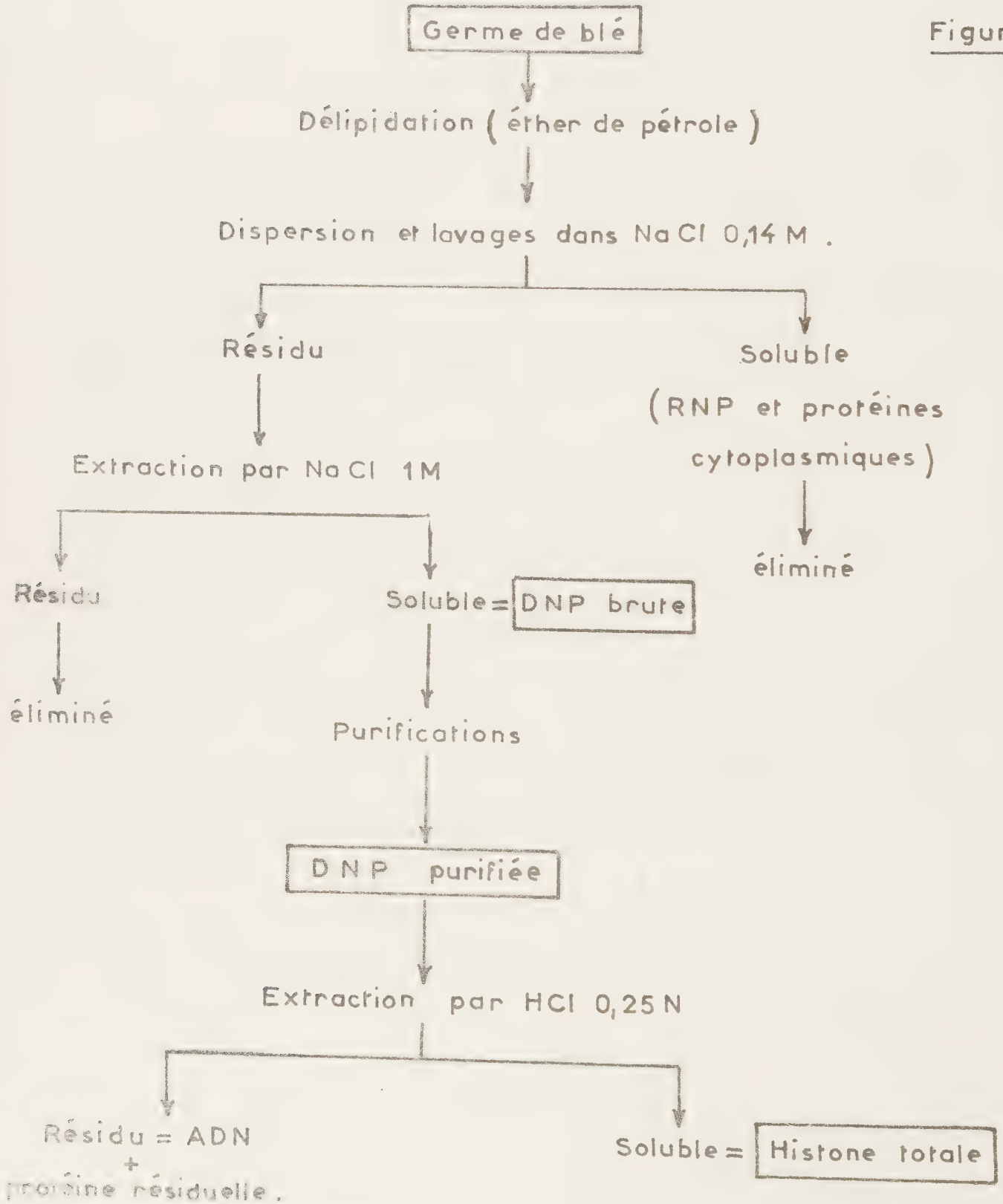
On a utilisé, pour la préparation du gel et pour le liquide des bacs à électrodes, le milieu HCl 0,01 N, pH 2,0, décrit par SMITHIES (1955). En vue d'accroître la migration et d'améliorer la résolution, du chlorure d'aluminium 0,06 mM a parfois été incorporé au gel, selon l'idée de HNILICA et al. (1966).

c) Préparation du gel:

- Mise en suspension de l'amidon (concentration 12 %;

# SCHEMA D'ISOLEMENT DE L'HISTONE

Figure 2



amidon Connaught, Université de Toronto) dans le milieu HCl 0,01 N.

- Chauffage jusqu'à ébullition; dégazage de l'empois.
- Coulage dans la cuve; refroidissement du gel.

d) Dépôt des échantillons:

On a employé le procédé d'insertion d'un papier filtre calibré (papier Whatman n° 3; 1,5 x 0,5 cm) imbibé de solution protéique, dans une fente pratiquée dans le gel refroidi. On dépose au maximum 6 échantillons par gel. Dans le cas du dépôt d'une histone totale, la solution protéique est préparée en dissolvant 3 mg dans 100 microlitres d'HCl 0,25 N et en insérant 3 papiers imbibés. On dépose ainsi 75 microlitres de solution à 3 % soit 2.250 gamma de protéine, soit encore 3.000 gamma par $cm^2$ de section de gel.

e) Conditions de migration:

La force ionique élevée du milieu HCl 0,01 N nécessite d'opérer sous un faible voltage (2 v/cm) et pendant une longue durée (18 heures). Il n'y a pas de précourant. La distance de migration est d'environ 10 cm (15 cm si on incorpore $AlCl_3$ au gel). Toutefois, une telle durée de l'opération implique de prévoir des bacs à électrodes de grande capacité (2 litres) afin de réduire la baisse d'intensité due à l'électrolyse du tampon.

f) Coloration:

Après électrophorèse, le gel est coupé en deux dans le sens de l'épaisseur (fil d'acier de diamètre 5/100). La moitié supérieure étant éliminée, on plonge la partie inférieure dans une solution d'amido-schwarz à 0,1 % dans acide acétique 7 % - éthanol 20 %, durant 30 mn. La décoloration du gel s'effectue par immersion, une nuit, dans l'acide acétique 7 %.

g) Evaluation quantitative des fractions:

Après décoloration totale, l'intensité des bandes est mesurée par densitométrie en lumière réfléchie (densitomètre intégrateur CHROMOSCAN). L'évaluation quantitative de chaque bande protéique est alors effectuée par le rapport de la surface de chaque pic à la surface totale d'absorption du diagramme.

2.4.1.2 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide:

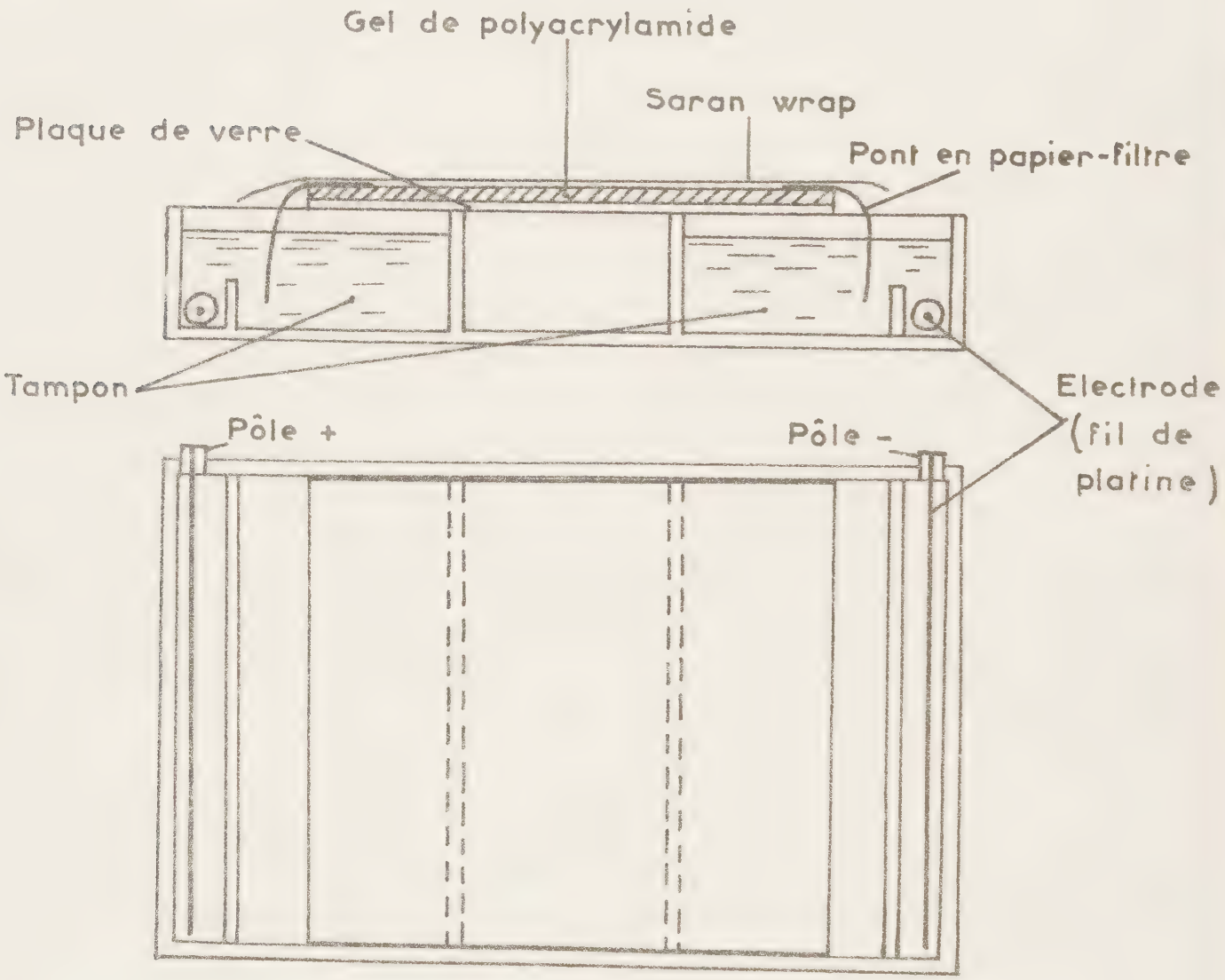
La technique retenue, qui est une adaptation de celle de PANYIM et CHALKLEY (1969), opère à partir de plaques horizontales de gels (au lieu de tubes verticaux).

a) Matériel:

- Générateurs de tension (voir gel d'amidon).
- Cuves en Altuglas, fabriquées au laboratoire, dont le schéma se trouve figure 3. Les contacts entre le gel et le tampon sont assurés par un

# SCHEMA DES CUVES D'ELECTROPHORESE

# POUR GEL DE POLYACRYLAMIDE .




Echelle 1/2

Figure 3

papier filtre. Le gel utilisé peut avoir une dimension maximale de 14 x 16 cm.

b) Nature des tampons:

Le milieu des bacs à électrodes est l'acide acétique 0,9 N (pH 2,4). Le gel contient également de l'acide acétique à un molarité voisine, comme l'explique le paragraphe suivant.

c) Préparation du gel:

Le gel n'est pas préparé dans les conditions habituelles (dissolution de cristaux d'acrylamide dans un tampon) mais par mélange de 3 solutions mères: A, B, C.

| | | |
|---|---|---|
| Solution A (monomère) | . Acrylamide Eastman Kodak | 60 g |
| | . NN' méthylène bis-acrylamide | 2 g |
| | . Eau distillée q.s.p. | 100 ml |
| Solution B (catalyseur 1) | . NNN'N' tétraméthyléthylènediamine (TEMED) | 5,15 ml |
| | . Acide acétique glacial | 43,2 ml |
| | . Eau distillée q.s.p. | 100 ml |
| Solution C (catalyseur 2) | . Persulfate d'ammonium | 200 mg |
| | . Urée (10 M) soit | 60 g |
| | . Eau distillée q.s.p. | 100 ml |

Les solutions A et B se conservent plusieurs semaines au froid. La solution C doit être préparée au moment de l'emploi.

Le gel est obtenu en réunissant les trois solutions A, B, C dans les proportions 20/10/50, puis en versant le mélange dans un moule démontable formé par deux plaques de verres espacées de 3 mm à l'aide de lames de plexiglas formant un cadre. La polymérisation a lieu en 30 mn environ. Contrairement aux premiers travaux sur le gel de polyacrylamide où la polymérisation s'avérait impossible en milieu acide, on constate ici que la formule retenue, notamment par la présence du TEMED, n'entraine aucune difficulté au niveau de la polymérisation.

Avant l'électrophorèse, on immerge le gel une nuit dans l'acide acétique 0,9 N.

La composition du gel est la suivante:

- Acrylamide 15 %
- NN' méthylène-bis-acrylamide 0,5 %
- urée 6,25 M
- pH 3,2 (après précourant)

d) Dépôt des échantillons:

La solution de protéine est déposée au moyen d'un seul papier filtre de 10 x 3 mm inséré dans le gel. La solution d'histone a une concentration de 0,5 % (1,5 mg/200 microlitres d'urée 10 M). Cela correspond à des dépôts de 75 $\gamma$ de protéines, soit 250 $\gamma/cm^2$ de section de gel (12 fois moins que dans le gel d'amidon précédemment décrit).

e) Conditions de migration:

On opère un précourant de 2 heures, à 7 v/cm. Après dépôt des échantillons, la migration a lieu durant 4h30 à 7 v/cm. (12 mA/cm$^2$ de section de gel). La distance de migration est alors voisine de 10 cm.

f) Coloration:

Mêmes conditions que pour le gel d'amidon, à l'exception du découpage du gel, inutile avec le polyacrylamide.

La figure 4 donne un exemple de la résolution obtenue avec une histone de germe de blé.

g) Evaluation quantitative des fractions:

On la réalise comme avec le gel d'amidon, par densitométrie, mais en lumière transmise et non réfléchie.

2.4.2 - Fractionnement préparatif :

2.4.2.1 - Précipitation sélective, à l'acétone:

250 mg d'histone sont dissous dans 30 ml d'eau. On y ajoute trois volumes d'acétone et 0,1 ml d'HCl concentré. Le précipité formé est centrifugé 10 mn à 18.000 t/mn.

Au surnageant obtenu, on rajoute de l'acétone par fractions de 10 ml. Lorsqu'un précipité apparait, on le sépare par centrifugation. En poursuivant l'opération jusqu'à 8 - 10 volumes d'acétone, on peut obtenir au moins 8 fractions successives de constitution différente, à partir de l'histone totale.

Les précipités obtenus après centrifugation sont lavés une fois à l'acétone-HCl (1.000/1), deux fois à l'acétone et disposés à l'air libre jusqu'à évaporation du solvant.

2.4.2.2 - Chromatographie sur colonne de CMcellulose:

a) Préparation de la colonne:

30 g de CMC Serva sont purifiés par lavages successifs dans NaOH 0,5 N / $H_2O$ / HCl 1 N / $H_2O$, cela 3 fois au total. L'échangeur ainsi traité est alors mis en suspension dans le tampon formiate de sodium 0,03 M, pH 4,8 (selon JOHNSON et al., 1964).

La CMC est enfin disposée dans une colonne de 25 x 1 cm, puis, après tassement, lavée par 150 ml de tampon formiate.

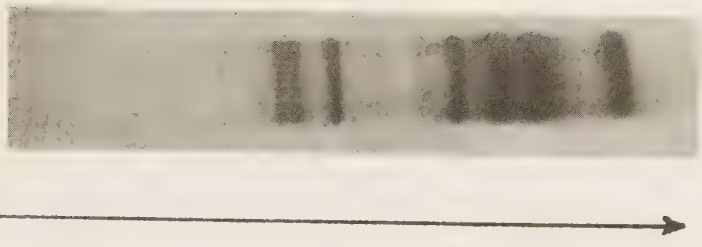
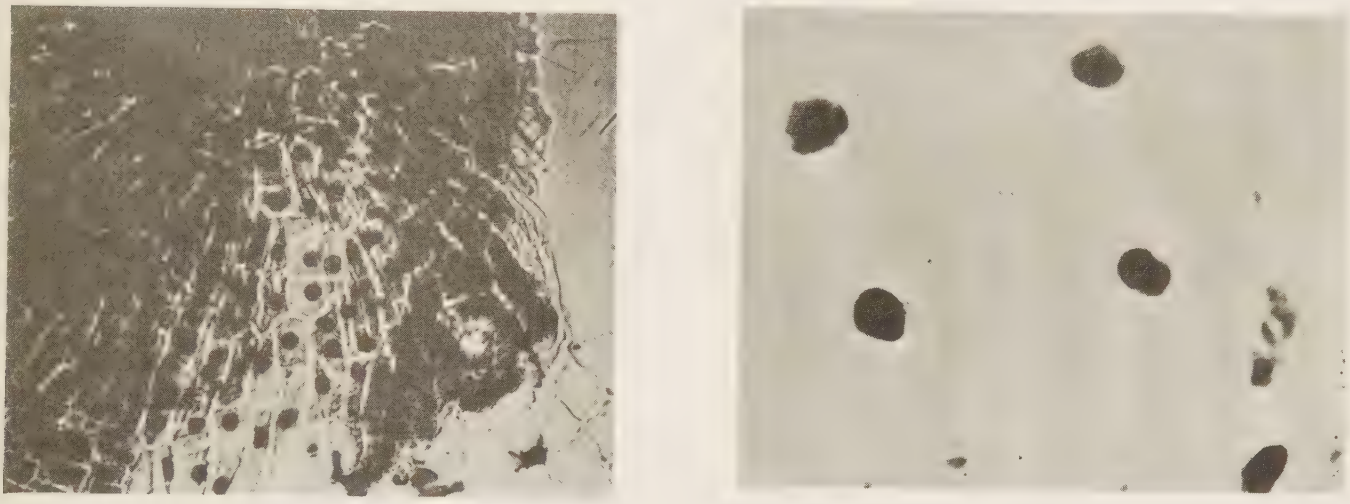



Figure 4: Diagramme électrophorétique en gel de polyacrylamide d'une histone de germe de blé.



x 700 x 2200

a b

Figure 5: Examen microscopique des noyaux cellulaires de germe de blé:
a: coupe d'un embryon de blé.
b: préparation de noyaux isolés.

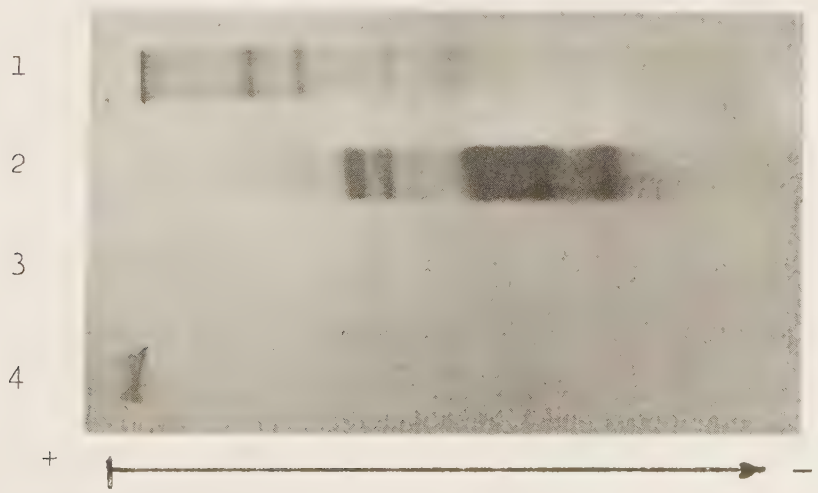



Figure 6: Diagrammes électrophorétiques en gel de polyacrylamide des différentes protéines isolées des noyaux cellulaires de germe de blé: (1) globuline nucléaire; (2) histone; (3) protéine non-histone de la DNP; (4) protéine acide de la chromatine.

b) Protéines déposées:

On dépose sur la colonne 3 ml de tampon dans lequel on a dissous 100 mg d'histone.

c) Elution:

On élue d'abord par du tampon formiate (70 ml) ce qui élimine quelques impuretés non retenues par la colonne, puis par un gradient linéaire de NaCl. Pour cela, on utilise un dispositif de type Varigrad contenant, dans les compartiments 1 et 2, respectivement 100 ml de formiate 0,03 M et 95 ml de NaCl 2 M.

L'effluent est recueilli par fractions de 5 ml, à raison de 6 fractions à l'heure. La durée totale du fractionnement est de 9 heures.

d) Analyse des fractions:

L'absorption de l'effluent est mesurée en continu à l'aide d'un dispositif de type Elugraphe, qui présente la particularité de travailler simultanément à 2 longueurs d'onde choisies arbitrairement. Nous avons généralement adopté 274,5 nm et 260 nm pour étudier respectivement les histones et les impuretés nucléiques et nucléotidiques des préparations.

Les fractions d'un même pic sont ensuite réunies, précipitées par addition d'un volume égal d'acide trichloracétique 30 %, centrifugées après repos d'une nuit au froid et séchées à l'air libre après lavages acétone-HCl et acétone.

2.4.3 - Isolement des principaux constituants de l'histone:

Compte tenu des observations effectuées lors des fractionnements préparatifs, on a élaboré les protocoles suivants permettant d'obtenir, dans un état de pureté satisfaisant, les principaux composants de l'histone.

Les techniques décrites sont applicables à l'histone totale, mais, bien entendu, demeurent valables (et donnent d'ailleurs des protéines encore plus pures) si le matériel de départ est une fraction d'histone contenant le composant recherché.

2.4.3.1 - Composant N° 1 (type $F_2a_1$):

On procède à la précipitation de l'histone par l'acétone, en milieu HCl: 5 volumes permettent de précipiter la totalité des fractions à l'exception du type $F_2a_1$. Ce dernier peut donc être recueilli par addition de 3 volumes supplémentaires d'acétone puis centrifugation.

2.4.3.2 - Composant N° 2 (type $F_2a_2$):

On procède à la précipitation de l'histone par l'acétone, en milieu HCl. On recueille les fractions précipitées entre 3,5 et 4,5 volumes lesquelles rassemblent les composants 2-3-4.

On soumet ces protéines à la chromatographie sur CMC au cours de laquelle les fractions 2 et 3-4 sont normalement éluées dans 2 pics différents. Le composant $F_2a_2$ se trouve donc isolé dans le pic 4.

2.4.3.3 - Composants 3-4 (type $F_2b$):

Ces deux fractions, de propriétés très voisines, peuvent être obtenues simplement au cours de la précipitation à l'acétone de l'histone totale (entre 3 et 3,5 volumes). Une purification est possible par chromatographie sur CMC et récupération du pic 3.

2.4.3.4 - Composants 5-6-7 (type $F_1$):

Ces fractions constituent également un groupe très homogène, que nous n'avons pas cherché à dissocier.

La seule technique permettant leur isolement, sans contamination par le type $F_2b$, semble être la chromatographie sur CMC, au cours de laquelle ces composants sont élués les premiers (pics 1 et 2).

## 2.5 - METHODES ANALYTIQUES DIVERSES

### 2.5.1 - Humidité:

On la détermine généralement par perte de poids durant un séjour de 90 mn à 130° C. Cependant, dans le cas de certains produits fragiles (ADN, DNP, histones), l'humidité est déterminée après séjour dans un dessicateur chauffant (55° C, sous vide) jusqu'à poids constant.

### 2.5.2 - Azote total:

On dose l'azote total selon la méthode KJELDAHL. Le catalyseur est le mélange $CuSO_4$ - $K_2SO_4$ (1/10). Le distillat est recueilli dans l'acide borique 2 % avec, pour indicateur coloré, le mélange rouge de méthyle-vert de bromophénol (1/1).

### 2.5.3 - Phosphore total:

On dose le phosphore selon la méthode colorimétrique de BRIGGS (1922) adaptée par MACHEBOEUF et DELSAL (1943): formation du complexe phosphomolybdique en présence d'hydroquinone et de sulfite de sodium, avec lectures au spectrophotomètre

à 700 nm. La minéralisation est cependant effectuée selon le procédé de THIVOLLE (1944) (catalyseur nitro-zincique).

2.5.4 - Protéines:

Une estimation colorimétrique des protéines a été réalisée selon les techniques de FOLIN (LOWRY et al., 1951) ou du biuret (GORNALL et al., 1949).

2.5.5 - Acides aminés:

Les acides aminés sont séparés et dosés à l'auto-analyseur Technicon, selon la méthode de MOORE et STEIN (1954) (1).

---

(1) Nous tenons particulièrement à remercier ici MM. PETIT et LEFEBVRE qui ont bien voulu accepter d'effectuer ces dosages dans leur laboratoire (C.E.R.D.I.A., Station de Biochimie et Physico-chimie des Céréales I.N.R.A., Massy).

# 3 - RESULTATS ET DISCUSSIONS

## 1ère PARTIE ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE SUR LES DNP ET LES HISTONES DU GERME DE BLE.

L'isolement de DNP, d'histone ou de fraction d'histone, n'est possible qu'après élaboration d'un mode opératoire rigoureux, respectant dans toute la mesure du possible l'intégrité moléculaire et adapté au matériel d'étude du laboratoire. Or, les techniques classiques, issues le plus souvent de travaux sur le thymus de veau ou la plantule du pois, n'apparaissent pas directement transposables au cas très particulier d'un organe de réserve tel que le grain de blé. Nous avons donc été conduits, pour les opérations d'isolement et de fractionnement, à élaborer des protocoles expérimentaux tenant compte des observations antérieures, mais mieux adaptés à nos conditions propres.

Nous avons retenu pour cela deux critères permanents de caractérisation des DNP et de leur fraction histone:

- la détermination des acides nucléiques et particulièrement de l'ADN, permettant d'apprécier la pureté en DNP des préparations isolées et d'estimer le rendement réalisé par les procédés d'extraction.

- l'aspect qualitatif des diagrammes électrophorétiques des protéines basiques apparemment associées à l'ADN au niveau des préparations nucléoprotéiques isolées.

Dans le cas particulier des préparations purifiées, ces deux critères ont été complétés d'un dosage des protéines totales.

Enfin, dans le grain de blé, nous avons étudié en premier lieu la région du germe, laquelle apparaissait de toute évidence, la plus riche en constituants nucléiques (cf. § 3.3.1), la plus dépourvue de composés de réserve insolubles et donc la plus propice à la mise au point de méthodes expérimentales nouvelles. Contrairement aux différents travaux antérieurs relatifs au blé, nous ne nous sommes cependant pas limités à la région du germe. Les DNP et les histones des autres tissus du grain, décelées par l'intermédiaire du dosage des acides nucléiques, ont en effet été l'objet d'études quantitatives et qualitatives que nous rapportons dans la partie concernant les aspects physiologiques.

## 3.1 - LES D.N.P. DU GERME DE BLE

Les préparations de germes utilisées dans cette étude, notamment pour la mise au point des méthodes expérimentales, sont d'origine industrielle (cf. § 2.1.1.). Elles présentent, en effet, l'avantage d'être disponibles en quantités élevées. Leur inconvénient est de provenir de lots de blés commerciaux, donc d'un mélange de variétés.

L'isolement de DNP végétales utilise généralement deux types distincts de procédés:

- soit un isolement à partir des noyaux cellulaires ou de la chromatine (organes à métabolisme intense), ce qui conduit bien à des DNP natives, mais avec de très faibles rendements.

- soit un isolement direct (tissus de réserve) aboutissant à des rendements beaucoup plus élevés mais à des préparations parfois contaminées ou dénaturées.

Le choix d'une technique applicable au germe de blé imposait donc à la fois une étude comparée de divers procédés appartenant à l'un ou à l'autre des deux types définis ci-dessus et une discussion apportant la justification de la méthode finalement retenue. Il s'agissait tout particulièrement de montrer que ce procédé respectait l'intégrité du matériel isolé, nous autorisant ainsi, a posteriori, à utiliser le terme "désoxyribonucléoprotéine du germe de blé".

### 3.1.1 - Etude comparée de diverses méthodes d'isolement des D.N.P.:

#### 3.1.1.1 - D.N.P. obtenues à partir de préparations de noyaux cellulaires de germe de blé:

L'isolement de noyaux cellulaires en parfait état de pureté et d'intégrité, reste le moyen le plus simple et le plus sûr pour obtenir des DNP pures et non dégradées.

Les techniques décrites par SHERIDAN et STERN (1967), en milieu saccharose-glycérol, et par ZAMPETTI-BOSSELER (1967), en milieu saccharose 0,25 M, n'ont pas donné entière satisfaction dans le cas du germe de blé. Nous avons, en revanche, pu retenir le principe des procédés de VASIL'EVA et al. (1969), en milieu glycérol 40 %, pH 6,8 et de BOULTER et al. (1965), en milieux saccharose 2 M et 2,62 M, décrits au § 2.1.5., en raison du bon rendement en noyaux et de la pureté des préparations.

Généralement, le rendement en noyaux s'établit vers 4 % du poids initial de germes, valeur également avancée par GOFSHTEIN (1967) mais inférieure à celle de STERN et MIRSKY (1952) (5,5 %). Dans nos conditions, les noyaux isolés rassemblent 20 % des DNP totales du germe, estimées sur la base de l'ADN.

Le choix d'une technique satisfaisante, nous a enfin amenés à contrôler la pureté et l'intégrité des préparations obtenues à l'aide d'un examen microscopique, après coloration spécifique.

La technique rapide utilisée (1) fait intervenir successivement:

- une fixation par la solution suivante (iode: 0,5 g, KI: 1 g, acide acétique: 4 ml, formol: 24 ml, eau q.s.p. 400 ml),
- une coloration par le carmin aluné.

Les noyaux apparaissent très nettement colorés en rouge carmin aussi bien dans le tissu d'origine que dans les préparations isolées (fig. 5) leur diamètre est d'environ 3 microns.

Il reste matériellement difficile d'isoler de telles préparations de noyaux à partir de quantités importantes de germes. C'est pourquoi, seules des analyses qualitatives telles que l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, ont pu être effectuées sur les différentes protéines nucléaires (fig. 6).

Il apparait alors que les protéines salino-solubles (suc nucléaire et ribosomes nucléaires), dites globulines nucléaires, correspondent essentiellement à deux composants électrophorétiquement lents. En revanche, les histones, protéines acido-solubles de la DNP nucléaire, donnent un diagramme caractéristique, à 7 composants. Enfin, si la protéine dite résiduelle ou non-histone de la DNP migre légèrement vers l'anode au pH considéré, la "protéine acide de la chromatine" n'apparait pas sur les diagrammes. Une étude particulière de ces deux dernières protéines acides devrait être effectuée de préférence avec des gels de pH alcalin.

3.1.1.2 - D.N.P. obtenues par extraction directe à partir des germes de blé:

Un isolement convenable de la DNP sur la seule base de ses propriétés de solubilité, requiert une connaissance préalable de celles-ci. Avant d'examiner comparativement les méthodes d'extraction directe, et afin de justifier leur principe même, nous mettons donc en évidence les caractéristiques de solubilité des nucléoprotéines du germe (RNP et DNP) en soulignant notamment la nécessité d'une élimination des RNP et autres protéines cytoplasmiques avant toute extraction des DNP.

a) Caractéristiques de solubilité des nucléoprotéines du germe:

En soumettant parallèlement des quantités égales de germes broyés et délipidés, à des extractions salines de molarité allant de 0 à 2 M selon la technique exposée § 2.3.1, on a constaté que la force ionique n'a qu'une influence limitée sur la quantité de protides solubilisés (70 à 77 % des protides totaux) et sur

---

(1) Dont nous devons la mise au point à M. RICHARD-MOLARD (Laboratoire de microbiologie, I.N.R.A., 16 rue Nicolas Fortin, PARIS 13ème), que nous remercions vivement.

la teneur en protéines (N x 5,7) des extraits lyophilisés obtenus (77 à 83 %). On a observé également, que l'emploi d'une dispersion vigoureuse n'augmente que faiblement (3 à 4 %) le taux de protéines solubilisées par rapport à une extraction douce, mais donne des extraits beaucoup moins purs, surtout aux forces ioniques élevées.

En revanche, les taux d'ARN et d'ADN extraits sont très fortement influencés par la force ionique, surtout dans le cas d'une dispersion efficace, ce qu'illustre la figure 7. Une extraction par simple mise en suspension du germe fait apparaître, en effet, à la fois un maximum de solubilité de l'ARN et un minimum de solubilité de l'ADN pour NaCl 0,14 M, mais n'assure qu'un rendement limité en ADN aux forces ioniques élevées ainsi que dans l'eau pure. Par contre, une dispersion (Ultra-Turrax) augmente la quantité d'ARN solubilisé, mais accroît considérablement le rendement en ADN à toutes les molarités NaCl, à l'exception du minimum (0,14 M et 0,3 M) qui demeure inchangé.

Il devient donc évident que la force ionique 0,14 M est optimale pour isoler successivement l'ARN et l'ADN respectivement sous forme de RNP et de DNP. Les premières sont solubilisées à cette force ionique, en même temps que de nombreuses impuretés, mais sans entraîner notablement de DNP; ces dernières sont alors obtenues relativement pures, soit avec un rendement faible mais non dissociées, à l'aide d'eau pure (principe de ZUBAY et DOTY, 1959), soit avec un rendement très élevé mais partiellement dissociées, à l'aide d'une concentration saline élevée (principe de MIRSKY et POLLISTER, 1942, 1946).

b) Extraction sélective préalable des RNP et autres protéines "cytoplasmiques":

La solubilisation de DNP convenablement débarrassées de RNP, impose cette phase préparatoire. Bien que le choix de la molarité 0,14 M soit ici fondamental, nous avons étudié systématiquement quelques autres facteurs (pH, centrifugation, type de dispersion, dilution, durée d'extraction) pouvant intervenir à ce niveau, afin de réaliser au mieux les conditions suivantes:

- éliminer un maximum de protéines non-DNP et d'impuretés diverses,
- n'extraire que des quantités négligeables de DNP,
- permettre (ou ne pas compromettre) l'extraction quantitative ultérieure des DNP, dans un état de totale intégrité.

Sans entrer dans le détail des influences, d'ailleurs assez limitées, de ces paramètres sur les quantités d'ARN, d'ADN, de protéines et d'impuretés extraites, nous rapportons seulement quelques observations:

Recherchant à ce stade une élimination maximale des RNP et des impuretés diverses, il apparait qu'une dispersion vigoureuse, suivie d'une centrifugation à faible vitesse (3.600 t/mn), correspondent aux conditions optimales.

INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE SUR LA SOLUBILISATION DE L'ARN ET DE L'ADN DE GERME DE BLE

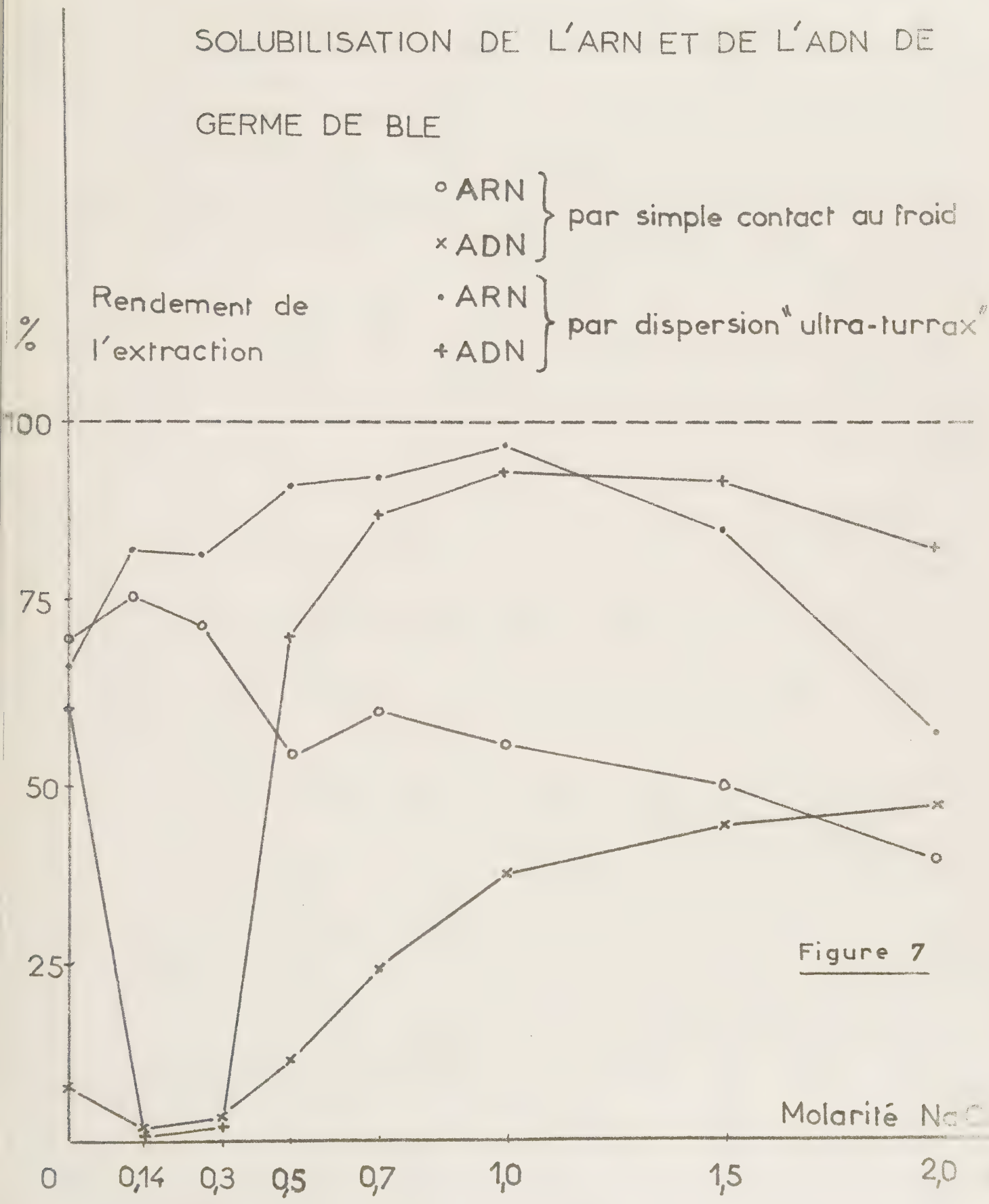



Figure 7

A l'inverse, une centrifugation trop rapide contribue à purifier le surnageant, notamment en provoquant la sédimentation d'une partie des organites contenant l'ARN (WOLFE et KAY, 1968), ce qui est ici à éviter.

L'utilisation d'une solution NaCl 0,14 M de pH acide (pH 3,5) présente l'avantage d'entraîner un maximum d'impuretés et de limiter les actions enzymatiques, mais semble modifier le matériel d'étude en le rendant moins apte à libérer les DNP dans la phase suivante. On a donc le choix entre deux possibilités: soit traiter par NaCl 0,14 M à pH neutre, ce qui assure un rendement élevé en DNP, soit par NaCl 0,14 M à pH 3,5 (DAVISON et al., 1954), ce qui permet d'obtenir une plus grande pureté initiale des DNP. Mais dans ces conditions, le rendement apparait inférieur de 15 à 20 %, même si, comme GOFSHTEIN et al. (1966), on opère un dernier lavage à pH neutre avant extraction des DNP.

Enfin, contrairement aux travaux concernant les tissus animaux, où de nombreuses précautions doivent être prises contre les actions protéolytiques, nous n'avons relevé aucune différence dans le produit final, selon que l'on travaille ou non au froid et avec ou sans inhibiteur d'enzyme (citrate, fluorure, EDTA-Na).

Il était par ailleurs intéressant de préciser la composition nucléique et azotée des fractions hydrosolubles et insolubles après dialyse de l'extrait NaCl 0,14 M. C'est ce qu'indiquent les résultats du tableau 3.

Tableau 3 : Composition de l'extrait par NaCl 0,14 M, de germe de blé :

| | Nature du composant | en gamma /100 mg s.s. | en % du composant extrait/composant total du germe | % du composant re-solubilisable dans NaCl 0,14 M |
|---|---|---|---|---|
| Extrait global NaCl 0,14 M | ARN | 10.280 | 85,2 | 46,2 |
| | ADN | 120 | 3,7 | 60 |
| | azote | 14.130 | 67,3 | 65,5 |
| Fraction hydrosoluble (type albumine) | ARN | 3.430 | 16,0 | 92,3 |
| | ADN | 36 | 0,6 | tr. |
| | azote | 13.270 | 36,0 | 95,1 |
| Fraction hydro-insoluble (type globuline) | ARN | 19.450 | 69,2 | 38,0 |
| | ADN | 230 | 3,1 | 70 |
| | azote | 15.200 | 31,3 | 35,7 |

On constate que l'ARN constitue près de 20 % du poids sec de la fraction hydro-insoluble, ce qui correspond à près de 70 % de l'ARN total du germe. Cette fraction est donc particulièrement riche en RNP. Toutefois, l'étude de ces composés n'a pas été poursuivie en raison de l'état de dénaturation du matériel après dialyse contre l'eau et lyophilisation. La redissolution dans NaCl 0,14 M est en effet très incomplète.

Ces observations semblent liées à celles de FEILLET (1965) et de FEILLET et BOURDET (1968) concernant la dénaturation des globulines de blé, car l'extrait salin 0,14 M correspond approximativement aux albumines-globulines de germe, la dénaturation portant essentiellement sur les fractions riches en ARN.

La sensibilité de ces dernières aux opérations de dialyse contre l'eau et, à un degré moindre, de lyophilisation, serait peut-être due à la présence de ribosomes dans l'extrait. L'isolement de ces organites dans leur complète intégrité nécessite en effet des conditions rigoureuses de pH, de force ionique, ainsi que la présence d'ions $Mg^{++}$ ou $Ca^{++}$ (WOLFE et KAY, 1968), de sorte que la simple préparation des globulines dans les conditions classiques, sans souci de préserver les ribosomes, pourrait expliquer une partie des dénaturations irréversibles des constituants.

Nous avons observé enfin que le traitement par NaCl 0,14 M n'aboutit jamais à une extraction quantitative de l'ARN: même après de nombreux lavages, le résidu contient encore 15 % environ de l'ARN total. Par ailleurs, les quantités très faibles d'ADN (3,7 % de l'ADN total du germe), extraites en milieu 0,14 M pourraient provenir soit d'ADN ou de polynucléotides non associés à des protéines, soit de DNP dégradées. Ceci expliquerait la présence systématique dans les extraits perchloriques à 0° C, de faibles quantités de composés réagissant avec la diphénylamine.

c) Extraction des DNP par l'emploi d'une force ionique élevée:

Ayant traité le germe de blé au moyen d'une solution saline isotonique, nous avons vérifié le bien-fondé du principe de MIRSKY et POLLISTER (1942), c'est-à-dire la possibilité d'extraire les DNP au moyen d'une solution saline de force ionique élevée. Les DNP ainsi obtenues sont cependant encore impures car le résidu lavé par NaCl 0,14 M n'est pas totalement débarrassé des RNP et autres composants non-DNP qu'une élévation de la force ionique peut rendre solubles.

Sans rapporter en détail les influences des divers paramètres classiques étudiées lors de la mise au point du procédé, nous retiendrons seulement les aspects suivants:

- Il est nécessaire d'opérer une dispersion vigoureuse pour extraire les DNP; en effet, une bonne accessibilité de celles-ci aux solvants, n'apparait possible qu'après éclatement de la plupart des cellules au moyen d'une fréquence quasi ultrasonique (Ultra-Turrax).

- L'emploi d'une force ionique très élevée (NaCl 2 M) permet de réduire la contamination par les RNP mais entraîne des difficultés supplémentaires (forte dissociation, volumes excessifs à manipuler au niveau de la précipitation).

Dans le cas d'une extraction par NaCl 1 M suivie de deux lavages de résidu, on observe que le rendement en ADN extrait par rapport à l'ADN total du germe, atteint environ 90 % mais que les préparations sont impures (35 % de composants non-DNP).

Comme le préconisent également MIRSKY et POLLISTER (1946), il est cependant apparu possible de purifier l'extrait de DNP par une série de précipitations en milieu 0,14 M et de redissolutions en milieu salin concentré: en effet, un abaissement de la force ionique jusqu'à 0,14 M provoque nécessairement une insolubilisation des DNP sans entraîner normalement la précipitation des autres constituants. Plusieurs cycles successifs de purifications sont cependant nécessaires du fait de l'existence probable, entre DNP et impuretés, de liaisons non instantanément rompues.

Après un tel traitement de purification, la DNP (obtenue avec un rendement de 80 à 88 %) possède la composition suivante: ADN: 40,0 %; ARN: 1,5 %; protéines: 58,5 % (cf. § 3.1.3.2.).

Signalons également que l'extraction des DNP a pu être aussi réalisée en remplaçant le chlorure de sodium par du chlorhydrate de guanidine 3 M, à l'ébullition, selon l'idée de RASMUSSEN et al. (1962).

Enfin, toujours dans le cas d'un isolement à force ionique élevée, nous avons tenté d'extraire les DNP par NaCl 1 M, sans traitement préalable par NaCl 0,14 M. Comme l'indiquait la figure 7, le rendement de l'opération est élevé mais cet extrait global est évidemment très impur. L'expérience montre que les purifications s'accompagnent de pertes très élevées (rendement final: 10-15 % de l'ADN initial) et que les préparations isolées ne contiennent que 31 % d'ADN.

d) Extraction des D.N.P. au moyen d'eau pure:

Le principe de ZUBAY et DOTY (1959) permet l'isolement de la DNP avec un rendement souvent peu élevé, lié à la difficulté de travailler en l'absence de toute trace de sel. En revanche, la DNP obtenue ne subit aucune dissociation, de sorte que sa composition et sa constitution protéiques sont vraisemblablement représentatives du matériel natif.

Effectivement, la DNP isolée par extraction aqueuse et purifiée par plusieurs précipitations et redissolutions en milieux respectivement NaCl 0,14 M et eau pure, n'est obtenue qu'avec un rendement de 25 à 30 % de la DNP totale du germe. Sa composition est la suivante: ADN: 39,6 %; ARN: 1,7 %; protéines: 58,7 %.

3.1.2 - Discussions: choix d'une méthode d'isolement des DNP de germe de blé:

L'examen critique des différentes méthodes qui viennent d'être étudiées comparativement, met en lumière les faits suivants:

- l'isolement des noyaux cellulaires constitue un moyen particulièrement sûr d'obtention des DNP, mais les rendements restent toujours faibles, ce qui exclut généralement les études de composition biochimique et les fractionnements protéiques préparatifs.

- les techniques d'extraction directe, notamment en milieu salin concentré, ont l'avantage de permettre, sans difficulté particulière, la préparation d'importantes quantités de matériel, mais peuvent avoir le défaut d'isoler un matériel protéique sur la seule base des critères de solubilité et donc, moins bien défini. Il n'est donc permis de retenir un tel type de procédé que dans la mesure où l'on aura démontré l'intégrité moléculaire des DNP isolées, notamment en se référant aux résultats quantitatifs et qualitatifs fournis par les autres méthodes.

On sait que le matériel protéique, isolé à partir des critères de solubilité dans NaCl 1 M et d'insolubilité dans NaCl 0,14 M, contient environ 40 % d'ADN apparemment associé à des protéines, ou ayant précipité avec elles. La question est donc de savoir si cette "désoxyribonucléoprotéine" peut être considérée comme une nucléohistone native, ou si elle représente partiellement ou totalement un artefact de préparation?

Il est certain, que le fait d'extraire en milieu salin concentré tel que NaCl 1 M, comme divers travaux antérieurs l'ont montré (HENSON et WALKER, 1970), détermine une dissociation de la DNP pouvant se traduire par la libération de certaines fractions histones; en outre, des réassociations non natives sont à craindre lors des précipitations en milieu 0,14 M.

Nous disposons néanmoins, d'un certain nombre d'arguments expérimentaux permettant d'admettre que les DNP ainsi isolées ne sont pas des combinaisons fortuites:

- la teneur en ADN des différentes préparations de DNP isolées dans les conditions décrites, apparait constante. Cetaux de 40 % en ADN est par ailleurs très proche de celui des DNP isolées d'autres tissus animaux et végétaux dans des conditions respectant l'intégrité moléculaire (BONNER et HUANG, 1963; SPIKER et CHALKLEY, 1971),

- les préparations obtenues présentent intégralement les mêmes propriétés de solubilité que les DNP animales et végétales classiquement connues.

- les DNP isolées dans des conditions n'entraînant pas de dissociation (extraction à l'eau pure), présentent une composition très voisine.

- la comparaison (figure 8) des diagrammes électrophorétiques des protéines acido-solubles (histones) extraites des DNP obtenues selon les différents procédés, ne met en évidence aucune différence significative, qu'il s'agisse d'ex-

traction directe par l'eau, le chlorure de sodium 1 M, le chlorhydrate de guanidine 3 M ou d'isolement à partir des noyaux cellulaires. Même lors d'une extraction par NaCl 1 M, sans traitement NaCl 0,14 M, on ne relève que des modifications mineures, en dépit du séjour de la DNP dans un milieu dissociant en présence de nombreuses impuretés d'origine cytoplasmique.

- enfin, comme nous le justifions ultérieurement (cf. § 3.2.5.), on note la grande analogie de constitution électrophorétique et de composition en acides aminés entre les protéines acido-solubles de la DNP ainsi préparées et les histones végétales classiquement connues.

Il semble donc, qu'en dépit de la dissociation partielle des DNP en milieu salin 1 M, il n'apparaisse pas de réassociation non native. Ceci conduirait à admettre que les sites libérés de l'ADN par les histones se dissociant, seraient de nouveau repris par des histones lors de la précipitation, la DNP finalement obtenue ne présentant donc aucune dénaturation apparente, au plan physico-chimique.

L'origine de ce phénomène pourrait être liée au caractère très basique des histones. Lorsque ces dernières sont les protéines les plus basiques du milieu NaCl 1 M, elles sont fixées de nouveau sur l'ADN, en priorité, lorsque la force ionique décroît. Si, en revanche, on était en présence de protéines plus basiques que les histones, telles les protamines, les histones seraient chassées de leur site initial. Ce principe est d'ailleurs utilisé par VAN DER WESTHUYZEN et VON HOLT (1971) pour isoler l'ensemble des histones d'une DNP animale. Le fait que les protéines les plus basiques se combinent toujours en premier lieu avec l'ADN (LOEB et CREUZET, 1970) semble donc autoriser ici, sans danger, l'emploi d'une force ionique élevée.

En conclusion de cette étude comparative, il apparaît clairement que l'ensemble des résultats fournis par l'isolement en milieu NaCl 1 M reste en accord avec ceux obtenus par d'autres méthodes, moins dénaturantes a priori. En conséquence, la grande simplicité de la technique inspirée du principe de MIRSKY et POLLISTER, ses possibilités d'obtenir avec un rendement élevé des préparations purifiées, l'apparente intégrité des DNP isolées, sont les raisons qui justifient pourquoi nous l'avons retenue de préférence aux autres.

### 3.1.3 - Caractéristiques physico-chimiques des D.N.P. isolées:

#### 3.1.3.1 - Evolution de la composition chimique et de la constitution protéique au cours de la purification:

La composition de l'extrait NaCl 1 M brut, après dialyse et lyophilisation est précisée par les valeurs du tableau ci-dessous. Il apparaît que cet extrait est très impur et, selon le calcul, qu'il contient environ 35 % de constituants non DNP. On note, par ailleurs, que la dialyse et la lyophilisation provoquent des dénaturations semblant toucher principalement les RNP mais très peu les DNP.

| Nature du composant | azote total | ADN | ARN |
|---|---|---|---|
| - en mg/100 mg s.s. | 12,65 | 25,0 | 4,6 |
| - en % du composant extrait/au composant total du germe | - | 90,2 | 6,3 |
| - % re-solubilisable dans NaCl 1 M | 58,7 | 96,5 | 62,0 |

En ce qui concerne l'évolution de la composition azotée et nucléique au cours des purifications, les résultats sont fournis dans le tableau 4, tandis que les modifications subies par la constitution électrophorétique des protéines basiques de la DNP sont illustrées sur la figure 9.

Tableau 4 : Evolution de la composition nucléique et protéique de la D.N.P. au cours des purifications successives:

| Composition | Extrait brut NaCl 1 M | 1° Précipité | 2° Préc. | 3° Préc. | 4° Préc. | 5° Préc. | 6° Préc. | 7° Préc. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % ADN | 25,0 | 35,1 | 36,3 | 37,3 | 38,8 | 39,8 | 40,0 | 40,1 |
| % ARN | 4,6 | 2,2 | 2,0 | 2,1 | 1,8 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| % azote | 12,65 | 14,77 | 15,27 | 15,53 | 15,57 | 15,57 | 15,65 | 15,61 |

Les résultats montrent que si la teneur en ADN s'accroît sensiblement pour se stabiliser sensiblement vers 40 %, le diagramme électrophorétique caractéristique de l'histone apparait dés la première précipitation. Les impuretés éliminées au cours des purifications suivantes, semblent donc correspondre à la fois à des constituants non protéiques (polyholosides) et, peut être, à des protéines non basiques n'apparaissant pas sur les diagrammes au pH en question. Cela pourrait expliquer que certains auteurs n'aient pas été gênés dans leurs fractionnements de l'histone de germe de blé par l'absence de purification de la DNP (JOHNS et BUTLER, 1962b; GOFSHTEIN et al., 1966)

L'ensemble des cycles de purification n'occasionne, contrairement à toute attente, que des pertes très limitées en DNP. Nous l'avons vérifié par dosage des acides nucléiques dans les différents surnageants et insolubles éliminés, afin de dresser le bilan des opérations (tableau 5).

Tableau 5 : Bilan des purifications de la D.N.P. (en % de l'acide nucléique total du germe):

| | Pertes au cours des purifications (1à7) | | | | | Pertes totales | Extrait initial | Composants récupérés |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3-4-5 | 6-7 | | | |
| | soluble 0,14 M | insoluble 1 M | | | | | | |
| ADN | 3,5 | 1,4 | 1,4 | 1,5 | tr. | 7,8 | 90,2 | 82,4 |
| ARN | 2,9 | 1,0 | 1,0 | tr. | tr. | 4,9 | 6,3 | 1,4 |

Ces observations sont en désaccord avec celles rapportées par STEDMAN et STEDMAN (1951) sur le germe de blé, LINDH et BRANTMARK (1966) sur le thymus de veau et SONNENBERG et ZUBAY (1966) sur le thymus de veau, qui signalaient des pertes très importantes en DNP, pouvant atteindre 20 % à chaque purification et rendant pratiquement impossible tout isolement de DNP purifiée.

Nous constatons qu'il n'en est rien pour ce qui nous concerne: les pertes se situent surtout au début, du fait de la présence d'un réseau fibreux de DNP apparemment encore mal établi et de l'élimination de quelques fractions probablement dégradées. Par la suite, la précipitation est quantitative et instantanée avec formation d'un réseau très dense de fibres blanches (figure 10). Aucune perte n'a plus lieu, si ce n'est par la manipulation de solutions inévitablement très visqueuses.

Pour ce qui est de l'ADN, le bilan total s'établit, en moyenne, de la façon suivante:

| | |
|---|---|
| ADN présent initialement dans le germe ..... | 100,00 |
| ADN éliminé dans les extraits par NaCl 0,14 M ..... | 3,45 |
| ADN extrait par NaCl 1 M { perdu au cours des purifications ..... | 7,80 |
| ADN extrait par NaCl 1 M { obtenu sous forme de DNP purifiée ..... | 82,40 |
| ADN non extrait (dosé dans le résidu final) ..... | 4,50 |
| Total ..... | 98,15 |

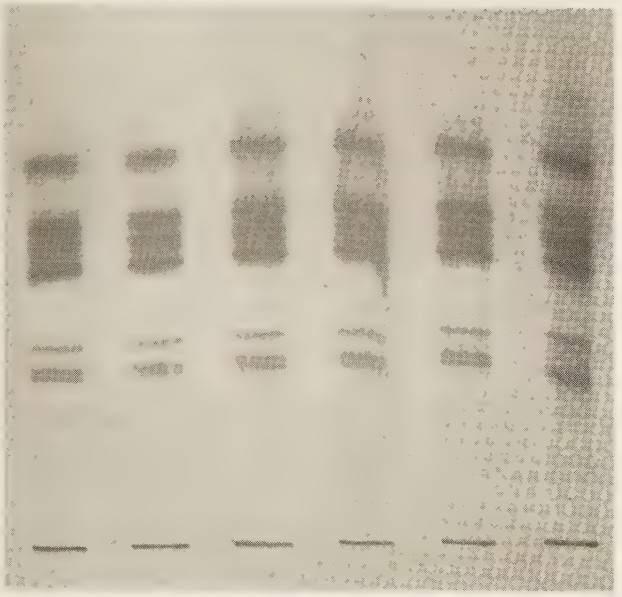



Figure 8: Diagrammes des histones isolées de DNP dans différentes conditions: (1) isolement des noyaux cellulaires; (2) extraction par l'eau; (3) extraction par le GuCl 3 M; (4) extraction par le NaCl 1 M; (5) extraction par le NaCl 1 M selon GOFSHTEIN; (6) extraction directe par NaCl 1 M, sans traitement 0,14 M.

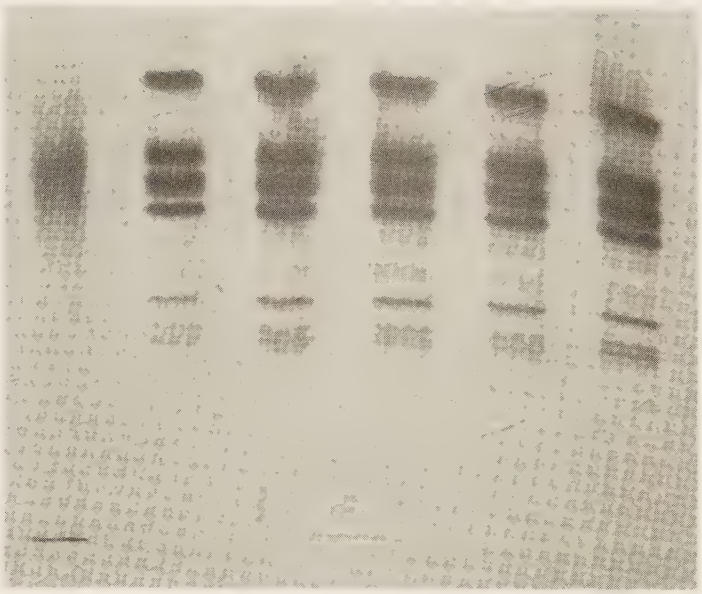



Figure 9: Evolution de la constitution électrophorétique des histones au cours des purifications de la DNP: (1) extrait brut; (2)(3)(4)(5)(6) DNP obtenues respectivement après 1,2,3,4,5 précipitations successives.

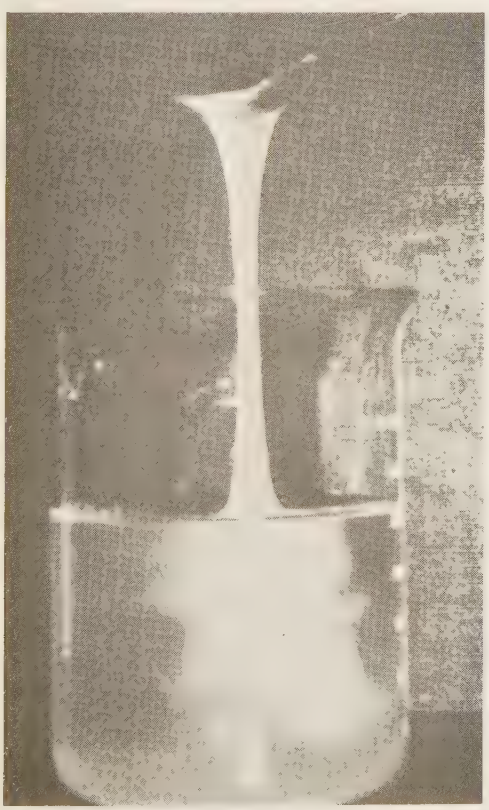


Figure 10: Précipitation en fibres de la DNP de germe de blé.

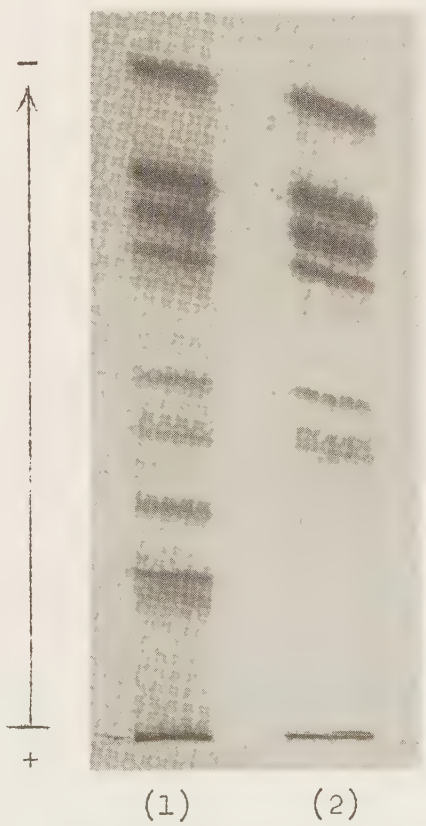



Figure 11: Diagrammes d'histones de DNP obtenues sous forme granuleuse (1) et fibreuse (2).

Il apparaît donc que le bilan des différents dosages est quasi quantitatif, que les pertes qui sont la rançon d'une purification très poussée demeurent faibles et que le rendement final de l'ADN sous forme de DNP purifiée atteint en théorie 82,4 %, ce qui apparaît satisfaisant.

Effectivement, à partir de 100 g de germes qui contiennent environ 1.000 mg d'ADN (cf § 3.3.1) et donc (en supposant que tout l'ADN soit sous forme de DNP) 2.500 mg de DNP, le rendement observé s'est toujours situé entre 2.000 et 2 200 mg s.s. de DNP purifiée, soit 80 à 88 %, ce qui est en accord avec la valeur théorique moyenne précédente.

On note que ce rendement est nettement supérieur à celui que rapportent JOHNS et BUTLER (1962b) (30 à 35 %) et que, d'autre part, le germe de blé industriel apparaît comme un matériel de choix pour la préparation de quantités élevées de DNP et d'histones, à l'inverse de nombreux tissus végétaux tels que ceux à métabolisme intense (à partir de 1 kg de plantule de pois, HUANG et BONNER (1962) n'isolent que 500 mg de chromatine correspondant à 50 mg d'ADN).

3.1.3 2 - Composition de la DNP purifiée:

Après purification, les différents constituants trouvés dans les préparations de DNP atteignent les taux moyens suivants:

| | | | |
|---|---|---|---|
| ADN ..... | 40,0 % ± 0,3 % | = 42 % | Protéines, calculées par différence: 58 % |
| ARN ..... | 1,5 % ± 0,2 % | | |
| NaCl résiduel, évalué à | 0,5 % | | |
| Azote total dosé ..... | 15,65% | | |

La lyophilisation directe des précipités de DNP imprégnés de NaCl 0,14 M explique les traces de sels présentes dans les préparations, mais non gênantes pour les études ultérieures. Un lavage par l'eau eut en effet entraîné des pertes sensibles en DNP.

La DNP contient 15,65 mg d'azote pour 100 mg s.s. Cet azote a pour origine les acides nucléiques et les protéines. Dans ce total, la part des acides nucléiques (dont le taux d'azote est 15,2 %) serait de 6,31 mg (soit 40 %) et celle des protéines de 9,34 mg (soit 60 %). Si l'on appliquait le coefficient 5,7 habituellement utilisé pour les protéines du blé et de ses dérivés, la teneur en protéines de la DNP serait de 9,34 x 5,7 = 53,2 % soit une valeur inférieure à celle calculée par différence (58 %). Pour justifier cet écart, il faudrait donc admettre, pour les protéines associées à l'ADN dans le germe, que le coefficient de transformation de l'azote soit de 58 / 9,34 = 6,22 c'est-à-dire analogue à celui utilisé pour les protéines animales (6,25).

S'il en est bien ainsi, et en tenant compte des deux formes (azote nucléique et protéique) présentes, une préparation de DNP purifiée est caracté-

risée par un taux d'azote total de 15,65 %, ce qui correspond à un coefficient de transformation (protéique-nucléique) de 100/15,65 = 6,4.

Le faible pourcentage d'ARN (1,5 %) présent dans les préparations et impossible à éliminer même après de nombreuses purifications, a déjà été signalé (HUANG et BONNER, 1965; BUTLER et al., 1968; BORKHSENIUS et al., 1969). Nous ignorons s'il s'agit ici d'une impureté résiduelle ou si cet ARN est un constituant normal de la DNP, comme par exemple un ARN impliqué dans le mécanisme de reconnaissance des sites de l'ADN par les histones ou encore un ARN lié à certaines protéines acides de la chromatine (BONNER et HUANG, 1966). Il ne représente d'ailleurs que 1,4 % de l'ARN total du germe (cf. tableau 5).

La teneur en ADN correspond à l'ordre de grandeur donné pour quelques autres DNP végétales: 36 à 46 % et notamment celles isolées de la plante de pois: 41 % (BONNER et HUANG, 1963). A notre connaissance, aucun travail appliqué aux graines de céréales n'avait encore précisé cette composition des DNP. Nous notons enfin que la composition donnée ci-dessus se rapproche étroitement de certaines analyses concernant le thymus de veau: ADN: 40 %; ARN: 1,9 %; protéines: 58,1 % (BORKHSENIUS et al., 1969).

### 3.1.3.3 - Caractéristiques de solubilité:

La DNP purifiée est entièrement soluble dans NaCl 1 M (la solution obtenue, très visqueuse, même pour des concentrations en DNP de 0,5 %, devient difficilement manipulable au delà de 2 %) et insoluble dans NaCl 0,14 M. En revanche, une lyophilisation semble entraîner une légère modification sur le plan de la structure macromoléculaire, se traduisant par une perte de solubilité: 10 à 12 % du poids sec d'une DNP purifiée et lyophilisée demeurent, en effet, insolubles dans NaCl 1 M.
En outre, une précipitation par dilution de la solution obtenue ne fait plus apparaitre un réseau de fibres aussi dense qu'à partir d'une DNP non lyophilisée. Donc, bien qu'aucune modification n'ait été constatée au niveau de la constitution protéique, la lyophilisation souvent nécessaire pour assurer la conservation des DNP et pour permettre leur analyse exacte, ne conviendrait pas lors d'études physiques (masse moléculaire, conformation macromoléculaire).

Dans le cas où la lyophilisation est effectuée sur une DNP non purifiée (extrait NaCl 1 M brut, dialysé). Le produit devient inutilisable pour l'isolement de DNP pure et d'histone. La purification d'une DNP brute lyophilisée entraîne, en effet, des pertes considérables, avec parfois absence de précipitation en milieu 0,14 M. Cela confirme que la lyophilisation, surtout si elle est précédée d'une dialyse de solution non purifiée, entraîne de graves dénaturations chez les nucléoprotéines, notamment par apparition de liaisons irréversibles entre leurs molécules et les impuretés insolubles.

Comme la plupart des travaux antérieurs, nous avons rapporté

que la précipitation de la DNP en milieu 0,14 M, avait lieu sous forme d'épaisses fibres. Exceptionnellement, il nous est arrivé d'obtenir un précipité de DNP sous forme entièrement granuleuse et de conserver cet état tout au long des purifications, cela en opérant dans les mêmes conditions qu'auparavant. Ce phénomène a déjà été signalé, notamment par LUCK et al. (1953) et par WELSH (1960), pour lesquels une DNP pourrait exister sous forme fibreuse ou non fibreuse, du fait que les lavages par NaCl 0,14 M seraient susceptibles d'éliminer parfois un facteur responsable du haut degré d'agrégation de la DNP fibreuse.

Selon nous, bien qu'une dilution trop élevée de la DNP puisse faire apparaître une faible fraction non fibreuse, notamment au cours de la première précipitation de l'extrait NaCl 1 M, la distinction entre les deux formes n'est liée, ni au nombre de lavages 0,14 M, ni aux conditions d'extraction, ni à une dégradation enzymatique. Nous pensons donc, comme VENDRELY et VENDRELY (1966), que la relation existant entre ces deux formes n'est pas entièrement clarifiée. Nous avons pu constater simplement, chez la forme fibreuse, une plus grande importance relative des fractions rapides de l'histone (Figure 11).

### 3.1.3.4 - Essais de fractionnement de la DNP:

Ne disposant pas des moyens, tels que l'ultracentrifugation mis en oeuvre, généralement, pour tenter cette opération, nous avons cependant obtenu un résultat significatif par extraction sélective selon le principe que KONAREV (1970) et SIDOROVA et al. (1971) ont employé avec la chromatine de différents végétaux.

A partir du germe épuisé par NaCl 0,14 M, nous avons opéré plusieurs extractions successives à des forces ioniques croissantes: 0,3 M; 0,5 M; 0,7 M; 1 M. Le tableau suivant donne quelques caractéristiques de ces fractions DNP.

| Molarité d'extraction | Quantité extraite (en % du total) | Teneur en ADN, après purifications | Aspect du précipité |
|---|---|---|---|
| 0,3 M | 0,5 % | 17,7 % | granuleux |
| 0,5 M | 78,5 % | 41,7 % | fibreux |
| 0,7 M | 18,8 % | 37,2 % | fibreux |
| 1,0 M | 2,2 % | 35,4 % | fibreux |

Si les trois dernières fractions ont des caractéristiques voisines, la première, très minoritaire, s'en distingue et semble se rapprocher de la fraction labile de la chromatine observée par SIDOROVA et al. (1971). En outre, les diagrammes électrophorétiques des protéines basiques isolées de ces fractions (fig. 12), montrent la présence de deux bandes supplémentaires de faible mobilité, décelables à l'état de trace dans certaines histones, ici concentrées dans l'extrait NaCl 0,3 M. D'une façon générale, la proportion relative des constituants rapides semble s'accroître avec la force ionique de l'extrait.

### 3.1.3.5 - Absorption ultra-violette des solutions de D.N.P.:

Les solutions salines de DNP présentent une absorption UV intense dont le spectre est la résultante de l'ADN et des protéines. Cependant, comme le coefficient d'extinction de l'histone de germe de blé (voir § 3.2.2.3): $E^{0,1\ \%}_{1\ cm}$ = 0,296 à 274,5 nm est environ 80 fois plus faible que celui de l'ADN ($E^{0,1\ \%}_{1\ cm}$ = 24,4 à 259 nm), le spectre reste voisin de celui d'un ADN pur (fig. 13) avec seulement un léger renflement vers 275 nm ($D.O._{258}$/ $D.O._{275}$ = 1,410 au lieu de 1,465 pour un ADN).

En fait, l'allure du spectre et le coefficient d'extinction varient sensiblement entre une solution saline de DNP, une solution saline d'ADN et un ADN solubilisé à partir d'une DNP par $HClO_4$ à chaud, comme cela ressort du tableau suivant.

| | Maximum d'absorption (nm) | Minimum d'absorption (nm) | $\mathcal{E}$ (P) | $E^{0,1\ \%}_{1\ cm}$ au maximum |
|---|---|---|---|---|
| ADN en solution NaCl | 258 | 230 | 7.470 | 24,4 |
| ADN sous forme de DNP en solution NaCl 1 M | 258 | 230 | 6.220 | 20,3 |
| ADN extrait de la DNP par $HClO_4$ à 90° C | 266 | 235 | 8.880 | 29,1 |

On constate notamment que l'ADN absorbe nettement moins dans l'UV lorsqu'il est sous forme nucléoprotéique, ce qui peut s'expliquer par l'existence d'attractions entre l'ADN et les protéines, entraînant pour les groupements impliqués dans l'absorption, un degré de liberté moindre que dans un ADN pur.

Ces résultats montrent aussi qu'il est possible de doser directement l'ADN sous forme de DNP en solution saline par simple lecture UV, en utilisant le coefficient d'extinction adequat. On peut même doser directement la DNP elle-même, compte tenu de sa teneur en acides nucléiques, l'extinction étant alors:

$$E^{0,1\ \%}_{1\ cm} \text{ à } 258 \text{ nm} = 8,44$$

Cette valeur est du même ordre, mais cependant plus faible que celle rapportée par SONNENBERG et ZUBAY (1966):

$$E^{0,1\ \%}_{1\ cm} = 10,6 \pm 0,5$$

pour la nucléohistone de thymus.

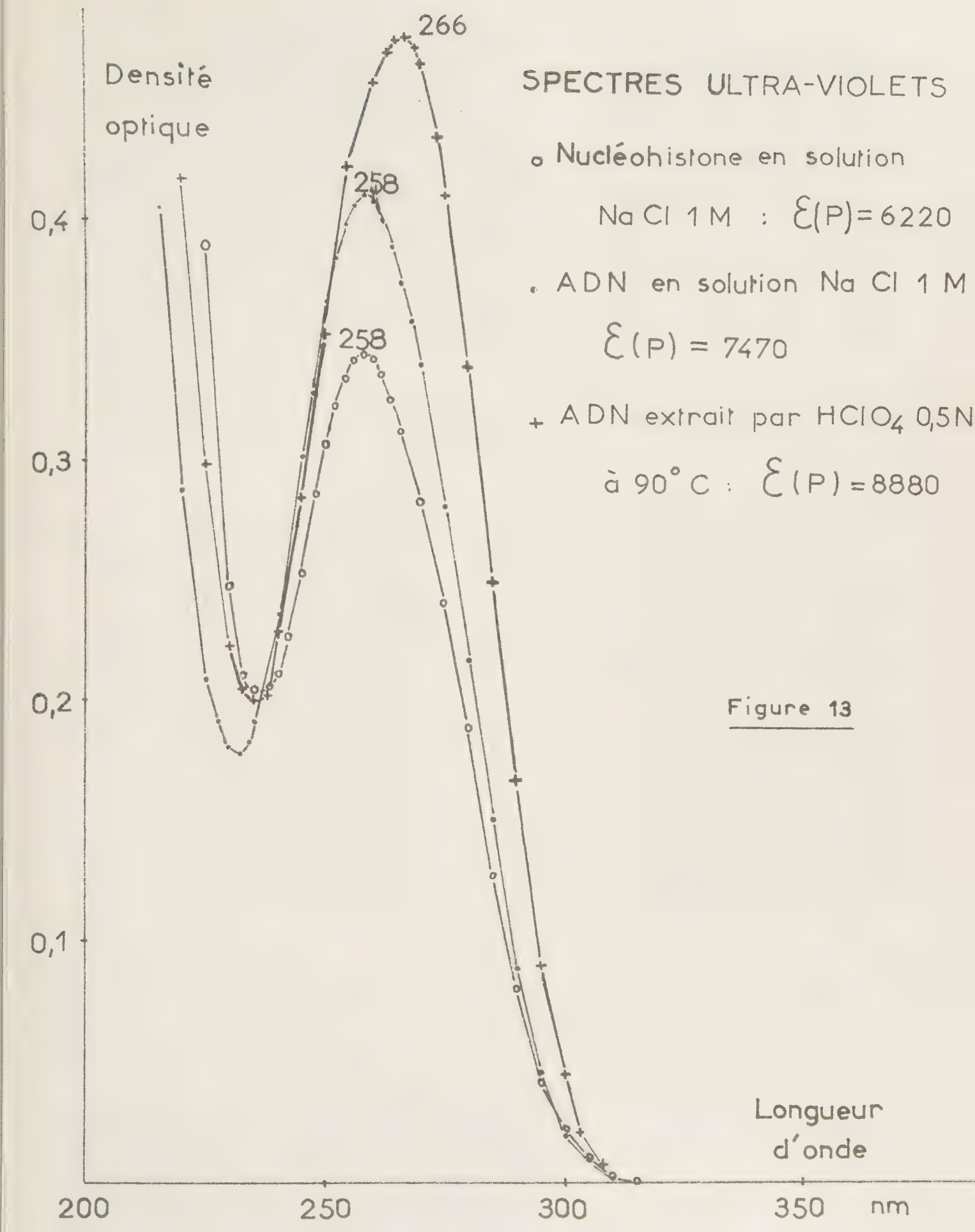

SPECTRES ULTRA-VIOLETS
o Nucléohistone en solution
Na Cl 1 M : ε(P) = 6220
. ADN en solution Na Cl 1 M
ε(P) = 7470
+ ADN extrait par HClO4 0,5N
à 90° C : ε(P) = 8880
Densité optique
0,4
0,3
0,2
0,1
266
258
258
Longueur d'onde
200
250
300
350
nm

Figure 13

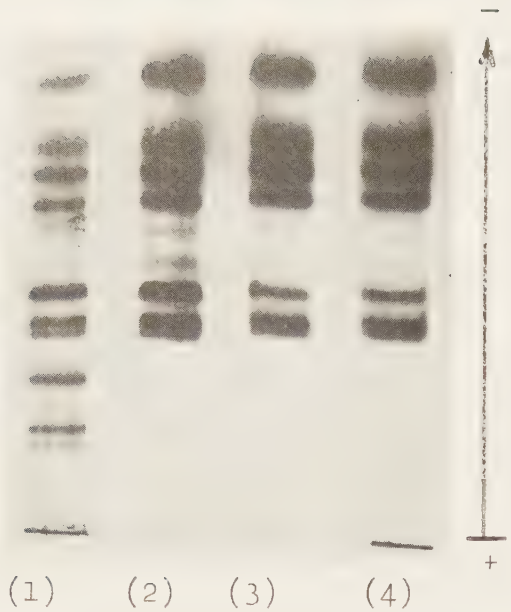



Figure 12: Diagrammes des histones de fractions de DNP obtenues par extractions successives sélectives: (1) 0,3 M; (2) 0,5 M; (3) 0,7 M; (4) 1,0 M.

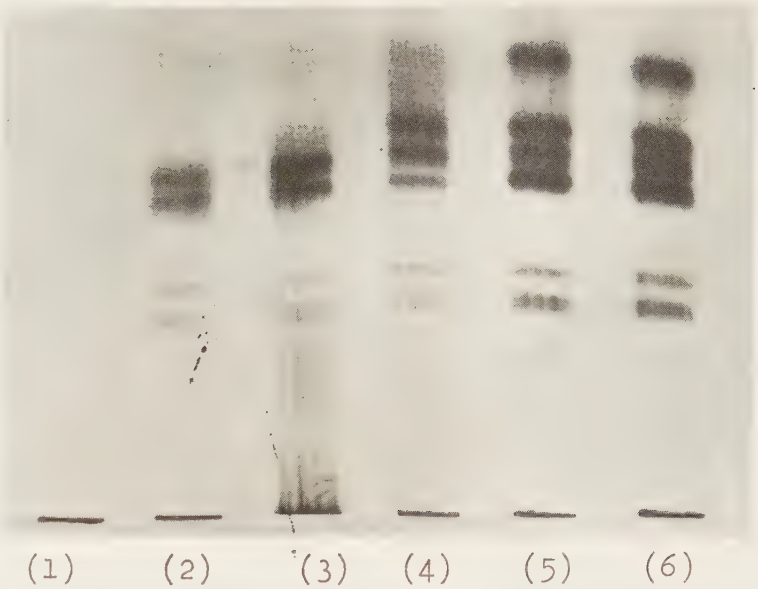



Figure 14: Influence du pH de l'acide sur la constitution électrophorétique des protéines extraites d'une DNP de germe de blé. Valeurs du pH: (1) 2,8; (2) 2,0; (3) 1,5; (4) 1,0; (5) 0,6; (6) 0,3.

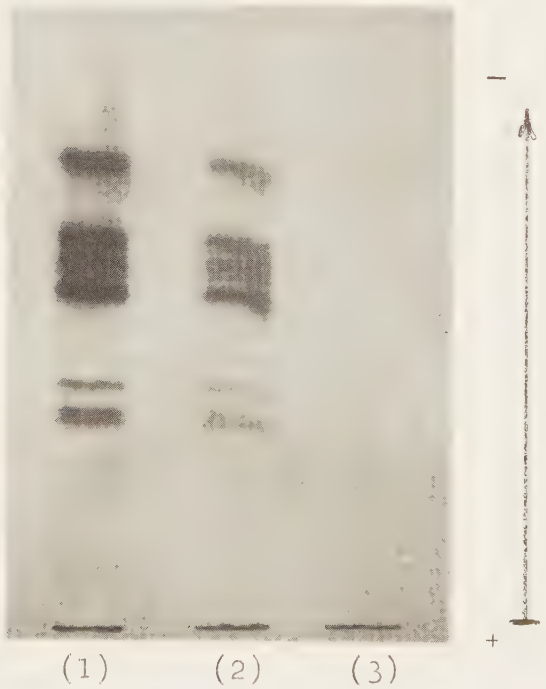



Figure 15: Diagrammes d'histones extraites successivement d'une DNP par HCl 0,25 N.

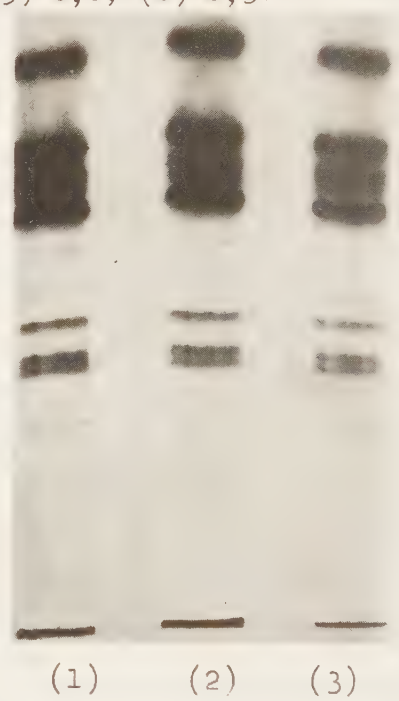
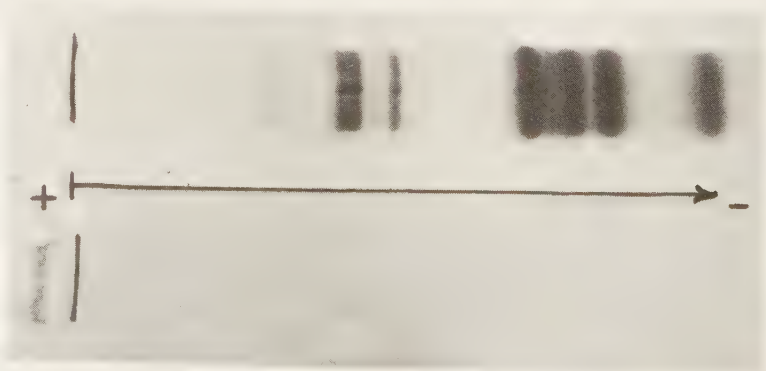



Figure 16: Diagrammes d'histones obtenues selon différents procédés: (1) Extraction HCl 0,25 N - Précipitation Ac. trichloracétique; (2) Extraction HCl 0,25 N - Dialyse et lyophilisation; (3) Extraction $H_2SO_4$ 0,25 N - Précip. éthanol.

Figure 19: Comparaison des comportements électrophorétiques à pH 3,2 d'une histone (1) et d'une protéine résiduelle (2) de germe de blé.



## 3.2 - LES HISTONES DU GRAIN DE BLE

A partir du matériel nucléaire préalablement isolé du germe (noyaux cellulaires ou nucléohistones), il est possible de séparer la fraction histone des autres composants (ADN et protéines résiduelles non-histones). Une solubilisation sélective et quantitative permet, en outre, de déterminer les proportions relatives des protéines de type histone et non-histone de la DNP.

Comme au niveau des DNP, l'élaboration d'une méthode satisfaisante d'isolement des histones nous a amenés à tester comparativement différents types de procédés.

### 3.2.1 - Choix d'une méthode d'isolement des histones de germe de blé:

Bien que la plupart des auteurs utilisent l'extraction classique en milieu acide à partir d'une DNP purifiée, il existe quelques procédés fondés sur d'autres principes. Ayant tenté de les appliquer au germe de blé, voici les observations effectuées:

- l'extraction acide à partir du germe épuisé par NaCl 0,14 M sans isolement préalable de la DNP, conduit à des protéines très impures, contrairement à ce qui se produit à partir d'un matériel pauvre en cytoplasme (MURRAY, 1966). IWAI (1964), qui applique cette technique à l'embryon de riz n'étudie pas, en effet, l'histone totale mais uniquement les fractions obtenues après passage sur CMcellulose.

- la précipitation par le sel de REINECKE (selon LINDH et BRANTMARK, 1966) des protéines basiques de l'extrait direct précédent, fournit encore des histones contaminées, ce qui est en accord avec les observations de ZAMPETTI-BOSSELER (1967) sur Allium cepa.

- l'isolement d'histone à partir d'une DNP dissociée en milieu NaCl 2 M par précipitation sélective de l'ADN à l'aide de $AlCl_3$ (LOEB, 1966) ou de HCl à concentration finale 0,25 N, n'a pas été retenu dans le cas du germe, essentiellement du fait de l'excès de sel, toujours difficile à éliminer totalement de la préparation protéique.

En conséquence, nous avons considéré que l'extraction classique en milieu acide à partir de DNP préalablement purifiée, constituait, a priori, un protocole obligatoire.

3.2.1.1 - Etude comparative de différentes conditions d'extraction en milieu acide:

Contrairement à une dissociation de la DNP en milieu salin concentré, qui maintient simultanément en solution les différents composants, le traitement acide possède l'avantage de dissocier ADN et histones en solubilisant uniquement celles-ci.

En vue d'opérer avec certitude une extraction sélective et quantitative d'histones non dégradées, il était cependant nécessaire d'étudier l'influence de plusieurs facteurs:

- nature de l'acide
- pH de l'extraction
- conditions de l'extraction (durée, température, type et nombre d'extractions, actions enzymatiques éventuelles).

Ces influences sont appréciées au moyen de deux critères: l'un, quantitatif, est le poids de protéine obtenu à partir de 100 mg de DNP purifiée, par extraction acide, précipitation à l'acide trichloracétique 15 %, lavage à l'acétone et dessication; l'autre, qualitatif, correspond à la constitution électrophorétique des protéines extraites.

a) Aspects quantitatifs:

Nous ne détaillerons pas l'influence relativement limitée de la durée et du type des extractions. Une dispersion violente et rapide conduit, en effet, aux mêmes résultats qu'un traitement doux et prolongé.

De même, il n'apparait pas de différence selon que l'extraction ait lieu au froid ou à la température ambiante.

En revanche, les différences plus significatives, observées selon la nature de l'acide, le pH et le nombre d'extractions, sont analysées dans le tableau 6.

b) Aspects qualitatifs:

L'influence des facteurs les plus significatifs a été illustrée par les diagrammes électrophorétiques des protéines isolées. La figure 14 montre ainsi l'importance du pH de l'acide: aucune protéine n'est isolée à un pH supérieur à 2,8,résultat en accord avec les travaux de MURRAY (1966). L'histone, encore incomplète à pH 1 (absence des fractions rapides), n'apparaît totale qu'à partir de pH 0,6 (HCl 0,25 N).

D'autre part, la figure 15 met en évidence la constitution des histones extraites successivement par HCl 0,25 N.

Tableau 6: Influence de quelques facteurs sur la quantité d'histones solubilisées à partir d'une DNP de germes.

| Facteurs étudiés | | | Quantité de protéines solubilisées (en mg/100 mg s.s. de DNP). |
|---|---|---|---|
| Nature et normalité de l'acide | pH de l'extraction | Nombre d'extractions | |
| $H_2SO_4$ 0,25 N | 0,6 | 2 | 45,7 |
| HCl 0,25 N | 0,6 | - | 45,9 |
| ac. acétique 0,25 N | 2,90 | - | tr. |
| ac. citrique 0,25 N | 2,25 | - | 6,5 |
| HCl | 4,0 | 2 | 0 |
| - | 3,5 | - | 0 |
| - | 2,8 | - | tr. |
| - | 1,5 | - | 14,5 |
| - 0,1 N | 1,0 | - | 39,8 |
| - 0,25 N | 0,6 | - | 45,9 |
| - 0,5 N | 0,3 | - | 46,1 |
| - 1,0 N | 0,0 | - | 46,2 |
| HCl 0,25 N | 0,6 | 1 | 41,3 |
| - - | - | 2 | 41,3 + 4,5 |
| - - | - | 3 | 41,3 + 4,5 + tr. |
| - - | - | 4 | 41,3 + 4,5 + tr. + 0 |

Contrairement aux résultats relatifs aux histones animales (DOUNCE et UMANA, 1962), nous avons pu vérifier que la température d'extraction ne modifie visiblement pas l'histone obtenue. Aucune trace d'hydrolyse n'apparait, même à température ambiante, et l'emploi de bisulfite 0,005 N préconisé par PANYIM et CHALKLEY (1969) pour inhiber la protéolyse, n'apporte aucune modification, montrant ainsi que les dégradations enzymatiques sont ici négligeables.

3.2.1.2 - Etude comparative de différentes conditions d'isolement des histones à partir de leur solution d'extraction:

Utilisant plusieurs idées couramment appliquées chez les histones animales, nous avons comparé les procédés de précipitation par addition soit d'éthanol, soit d'acétone, soit d'acide trichloracétique et de lyophilisation après dialyse. Les diagrammes des histones obtenues sont rapportés sur la figure 16.

a) Précipitation par l'éthanol:

Cette technique n'est utilisable qu'à partir d'un extrait sulfurique d'histone, le chlorhydrate d'histone n'étant pas précipité par l'alcool. On observe que la réaction de précipitation est accélérée par les basses températures: un séjour de 18 à 24 heures à -20° C provoque la précipitation totale du sulfate d'histone en présence de 2,5 à 3 volumes d'éthanol Le même résultat n'est obtenu à température ambiante qu'à l'aide d'au moins 5 volumes de solvant.

On note également, qu'après alcalinisation de la solution sulfurique par $NH_4OH$ jusqu'à pH 10 ou 11 (zone isoélectrique des histones) la précipitation est instantanée. Cependant, le procédé présente l'inconvénient d'amener une précipitation simultanée de sulfate d'ammonium si la concentration en éthanol est trop élevée.

Dans tous les cas, l'histone précipitée peut être déshydratée par des lavages successifs (éthanol, éthanol-éther, éther ou acétone-HCl, acétone). Le rendement final de la précipitation est de l'ordre de 90 %, des pertes inévitables se produisant notamment lors du dernier lavage en milieu neutre (éther ou acétone).

b) Précipitation par l'acétone:

Le principe et la mise en oeuvre de ce procédé sont à rapprocher de la précipitation par addition d'éthanol.

Nous avons cependant mis en évidence les différences suivantes:

- contrairement à l'éthanol, l'acétone entraine une précipitation progressive et sélective du chlorhydrate ou du sulfate d'histone,
- la précipitation, non influencée par la température, n'est totale qu'après au moins 8 volumes d'acétone.

c) Précipitation par l'acide trichloracétique:

Ce procédé est le plus simple et le plus quantitatif, à condition d'utiliser une concentration finale de 15 % au moins. C'est pourquoi nous l'avons mis en oeuvre lors de l'étude systématique précédente relative aux conditions d'extraction. Après précipitation, lavage du précipité à l'acétone-HCl (1.000/1 : v/v) et dessication, le rendement est, en effet, proche de 100 %.

En revanche, si la concentration en acide est inférieure à 15 %, on observe des pertes au niveau des fractions électrophorétiquement lentes, ce qui confirme les observations de JOHNS (1964) avec l'histone de thymus.

d) Dialyse et lyophilisation:

Une dialyse de l'extrait d'histone par HCl 0,25 N, contre une solution HCl 0,001 N, permet d'éliminer l'excès d'acide et les traces de sels présentes, en préservant l'histone d'éventuels phénomènes d'agrégation aux pH supérieurs à 3.

La lyophilisation de la solution ainsi dialysée, contrairement aux observations précédentes relatives aux DNP brutes, fournit une excellente préparation avec des pertes très limitées (rendement final moyen: 92%).

3.2.1.3 - Discussions et justifications de la méthode de choisir:

L'ensemble des observations qui viennent d'être rapportées, permet de faire un choix des conditions optimales d'isolement de l'histone de germe de blé.

S'il est bien entendu que cette histone ne peut être valablement obtenue que par extraction acide d'une DNP préalablement isolée et purifiée, il apparait aussi que seuls les acides forts et à un pH inférieur ou égal à 0,6 (HCl 0,25 N), sont utilisables.

Le palier de 46 % de la DNP, très reproductible, observé lorsqu'on abaisse le pH (tableau 6), s'accorde en effet aux observations qualitatives (fig. 14) et semble bien correspondre à l'extraction de l'histone totale. Des traitements ultérieurs du résidu par HCl 1 N ou par NaCl 2 M à froid, ne permettent d'ailleurs pas d'isoler une fraction protéique supplémentaire.

Il convenait également de savoir si l'extraction acide des histones n'entraînait pas de protéines d'un type différent (dites résiduelles), également constitutives de la DNP, qu'il ne faut pas confondre avec d'autres protéines non-histones, dites globulines, originaires du suc nucléaire (cf. fig. 2).

Nous ne le pensons pas, car, d'une part la protéine résiduelle possède en principe un caractère acide et ne peut être isolée de la DNP que par un traitement en milieu alcalin ou encore une déprotéinisation par le chloroforme-octanol; d'autre part, cette protéine migre vers l'anode en électrophorèse à pH 3,2 (cf. § 3.2.3) et apparaîtrait donc sur les diagrammes d'histones, ce qui n'est pas le cas.

En outre, compte tenu des résultats de la figure 15 qui montre que deux extractions sont suffisantes (la troisième n'enlevant aucune protéine visible) et de la figure 16 qui met en évidence l'identité des histones, précipitées selon divers procédés, on a finalement retenu le protocole décrit § 2.3.2 qui permet vraisemblablement un isolement optimal de la fraction histone.

Admettant ainsi que les conditions décrites permettent une extraction quantitative et sélective des histones, nous constatons que les protéines constitutives de la DNP de germe (58 % environ) sont représentées à raison de 80 % pour les histones (46 % de la DNP) et de 20 % pour les protéines résiduelles (12 % de la DNP).

Les proportions respectives de ces deux types de protéines sont d'ailleurs confirmées par l'analyse du résidu après extraction de l'histone, qui fait apparaitre un rapport acides nucléiques/protéines résiduelles de 3,35 très proche de celui observé dans la DNP (3,45).

Observons cependant que nos conditions opératoires diffèrent de celles rapportées dans les travaux classiques sur les histones animales, où l'on signale une plus grande difficulté à extraire la totalité des composants histones, notamment le type riche en arginine dit $F_3$. Les protocoles alors utilisés, qui font intervenir parfois 4 extractions successives (COIRAULT et al.,1966) ou des acides 0,4 N ou 0,5 N (PANYIM et CHALKLEY, 1969; VENDRELY et VENDRELY, 1966), n'apparaissent pas justifiés dans le cas de l'histone du germe.

Nos observations s'opposent en outre, à celles de STEDMAN et STEDMAN (1951) qui pratiquent 8 extractions successives pour isoler l'histone de germe de blé, mais vérifient celles de JOHNS et BUTLER (1962b) et de GOFSHTEIN et al. (1966) qui considèrent l'extraction complète après emploi de HCl 0,2 N ou 0,25 N.

Remarquons enfin, que l'histone de germe apparaît plus aisément extractible de la DNP que la plupart des histones animales (thymus de veau) et que certaines histones végétales (pois), ce qui semblerait impliquer l'absence de composant histone très fortement associé à l'ADN.

### 3.2.2 - Propriétés physico-chimiques de l'histone de germe :

#### 3.2.2.1 - Aspect, pureté et solubilité:

La teneur moyenne en azote des histones isolées du germe est de 15,80 %. Si l'on admettait que le rapport protéines/azote est de l'ordre de 6,25 cela correspondrait à une pureté satisfaisante (98,7 %).

L'analyse de l'histone permet toujours de déceler des traces d'ARN (provenant vraisemblablement de l'ARN de la DNP, partiellement solubilisé lors du traitement acide) et de phosphore. Cet élément pourrait avoir l'ARN pour origine, mais on ne peut écarter l'hypothèse d'autres formes de phosphore, toujours présentes dans les histones animales, notamment la phosphosérine (SHEPHERD et al., 1970).

L'aspect physique de l'histone dépend de son mode de préparation. Ainsi, par dialyse et lyophilisation, elle se présente sous forme de légers flocons blancs instantanément solubles dans l'eau à pH neutre. En revanche, par précipitation à l'alcool ou à l'acide trichloracétique, on obtient une poudre dense blanche,

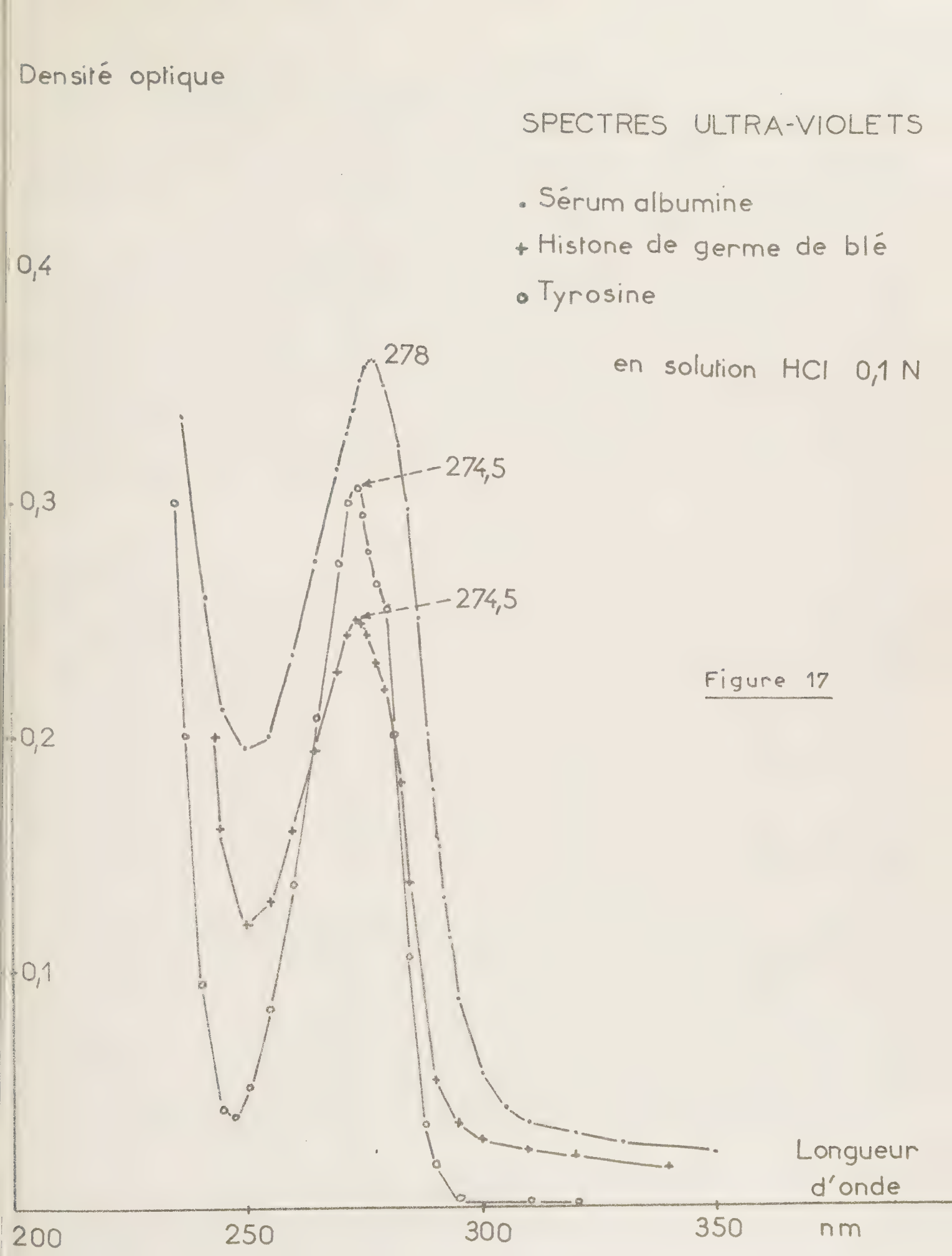

Densité optique
SPECTRES ULTRA-VIOLETS
. Sérum albumine
+ Histone de germe de blé
o Tyrosine
en solution HCl 0,1 N
0,4
0,3
0,2
0,1
278
274,5
274,5
Longueur d'onde
200
250
300
350
nm

Figure 17

plus difficile à solubiliser dans l'eau. Il est donc vraisemblable que la précipitation de l'histone puisse entrainer une légère dénaturation au niveau de la configuration moléculaire (notamment par passage de la structure de type hélices alpha en hélices béta comme l'ont remarqué DE LOZE (1958) et BRADBURY et CRANE-ROBINSON (1964). Ceci n'entraînerait pas de modification visible en électrophorèse mais se traduirait par une légère perte de solubilité dans l'eau.

Dans l'ensemble, les histones de germe obtenues sont cependant très solubles dans les acides dilués, les solutions de NaCl ou d'urée, et même les solutions alcalines, au voisinage du pH isoélectrique. Cela s'oppose aux caractéristiques des histones animales pour lesquelles on observe une moins grande solubilité. Ainsi l'alcalinisation d'une solution aqueuse d'histone de thymus provoque une précipitation partielle, ce qui n'a jamais lieu avec le germe. De même la précipitation totale de l'histone est assurée par une concentration d'éthanol minimale de 45 % chez le thymus (BIJVOET, 1957; UI, 1957) mais de 70 % chez le germe, à température égale.

### 3.2.2.2 - Composition en acides aminés:

Le tableau 7 présente l'analyse des acides aminés (en moles pour 100 moles des A.A. présents) d'une histone de germe de blé, comparativement à des résultats de travaux antérieurs concernant la même histone (JOHNS et BUTLER, 1962b; GOFSHTEIN et al., 1966) ainsi qu'une histone de thymus de veau (HNILICA et al., 1965).

Ces résultats confirment à nouveau la nature histone de la protéine considérée, du fait de la prédominance des acides aminés basiques (25,3 % des A.A. totaux) et de la similarité avec les analyses présentées par les autres auteurs.

L'absence de cystéine, caractéristique des histones, traduit également une absence de contamination de l'histone de germe par des protéines cytoplasmiques.

Le taux de tryptophane, que les conditions utilisées n'ont pas permis de déterminer, a pu cependant être estimé indirectement par spectrophotométrie différentielle (méthode de GOODWIN et MORTON, 1946) à l'aide de la formule:

$$M \text{ (moles de tryptophane)} = (0{,}263 \times E_{280\ nm} - 0{,}170 \times E_{294{,}4}) \times 10^{-3}$$

qui fournit le taux de 0,2 %. Cette faible valeur explique le spectre UV particulier de l'histone (cf. § 3.2.2.3). Par ailleurs, la teneur en tyrosine, évaluée par une formule similaire, est de 2,0 %, ce qui concorde avec l'analyse automatique.

### 3.2.2.3 - Spectre ultra-violet de l'histone de germe:

La figure 17 qui présente les spectres UV de l'histone de germe et de la sérumalbumine bovine, en solution acide, fait apparaitre de nettes différences:

- le maximum du spectre se situe vers 274,5 nm pour l'histone , au lieu de 278 pour la sérumalbumine,

Tableau 7: Analyse des acides aminés de quelques histones
(en moles pour 100 moles des acides aminés présents).

| | Histone de germe de blé | | | Histone de thymus de veau: HNILICA et al., 1966. |
|---|---|---|---|---|
| | Résultats personnels | JOHNS et BUTLER, 1962 b. | GOFSHTEIN et al., 1966. | |
| Ac. aspartique A | 4,5 | 4,4 | 6,0 | 4,8 |
| Thréonine | 5,6 | 5,4 | 5,6 | 5,6 |
| Sérine | 4,4 | 4,9 | 5,3 | 6,0 |
| Ac. glutamique A | 7,6 | 8,6 | 7,2 | 9,0 |
| Proline | 7,5 | 5,1 | 6,2 | 5,0 |
| Glycocolle | 8,0 | 8,1 | 9,1 | 8,4 |
| Alanine | 13,0 | 15,5 | 14,1 | 13,7 |
| Valine | 5,9 | 5,5 | 5,7 | 5,6 |
| Cystéine | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Méthionine | tr. | 0 | 0,7 | 1,1 |
| Isoleucine | 5,1 | 12,3 | 5,4 | 4,2 |
| Leucine | 8,1 | | 7,5 | 7,7 |
| Tyrosine | 2,1 | 1,7 | 2,0 | 2,4 |
| Phénylalanine | 2,4 | 2,2 | 2,3 | 1,5 |
| Lysine | 15,3 | 17,6 | 11,5 | 14,4 |
| Histidine B | 1,8 | 1,5 | 2,0 | 1,9 |
| Arginine | 8,2 | 7,3 | 8,7 | 8,6 |
| Lys / Arg | 1,86 | 2,40 | 1,35 | 1,67 |
| Arg / Lys | 0,54 | 0,41 | 0,76 | 0,60 |
| Acides A | 12,1 | 13,0 | 13,2 | 13,8 |
| Basiques B | 25,3 | 26,4 | 22,2 | 24,9 |
| B / A | 2,09 | 2,03 | 1,68 | 1,80 |

- le coefficient d'extinction de l'histone est beaucoup plus faible ($E^{0,1\ \%}_{1\ cm}$ = 0,296) que celui de la sérumalbumine ($E^{0,1\ \%}_{1\ cm}$ = 0,698).

L'explication est fournie par la composition en acides aminés aromatiques des deux protéines: la sérumalbumine possède approximativement le spectre d'absorption du tryptophane tandis que celui de l'histone, pauvre en tryptophane, est essentiellement le fait de la tyrosine (maximum: 274,5 nm).

En outre, l'examen des spectres UV des mêmes protéines en solution alcaline (NaOH 0,1 N) (fig. 18), fait ressortir que:

- le maximum du spectre de l'histone passe de 274,5 à 293 nm, tandis que celui de la sérumalbumine n'est que légèrement décalé.

- le coefficient d'extinction de la sérumalbumine augmente d'environ 24 % tandis que celui de l'histone s'accroit de 75 % pour atteindre la valeur $E^{0,1\ \%}_{1\ cm}$ = 0,250 à 293 nm.

Cela confirme l'explication précédente, car le spectre du tryptophane n'est pas modifié en milieu acide ou alcalin. En revanche, celui de la tyrosine est fortement influencé qualitativement (passage de 274,5 à 294 nm, du maximum) et quantitativement (accroissement de 82 % du $\mathcal{E}$(M)).

Il apparait enfin qu'un dosage spectrophotométrique précis de l'histone est hasardeux, car la moindre impureté non-histone des préparations est susceptible d'apporter des traces de tryptophane dont l'effet sur l'absorption totale est important.

3.2.2.4 - Détermination quantitative de l'histone par colorimétrie:

La détermination colorimétrique de l'histone apparaît possible soit selon la réaction du biuret (GORNALL et al., 1949), soit selon la réaction de FOLIN (LOWRY et al., 1951) laquelle est environ 40 fois plus sensible.

Les courbes d'étalonnage de ces deux réactions ont permis de déterminer les coefficients d'extinction de l'histone de germe, comparativement à ceux de la sérumalbumine.

| | Histone de germes | Sérumalbumine |
|---|---|---|
| Réaction du biuret $E^{1\ \%}_{1\ cm}$ à 545 nm | 0,520 | 0,515 |
| Réaction de FOLIN $E^{100\ /ml}_{1\ cm}$ à 550 nm | 0,210 | 0,202 |

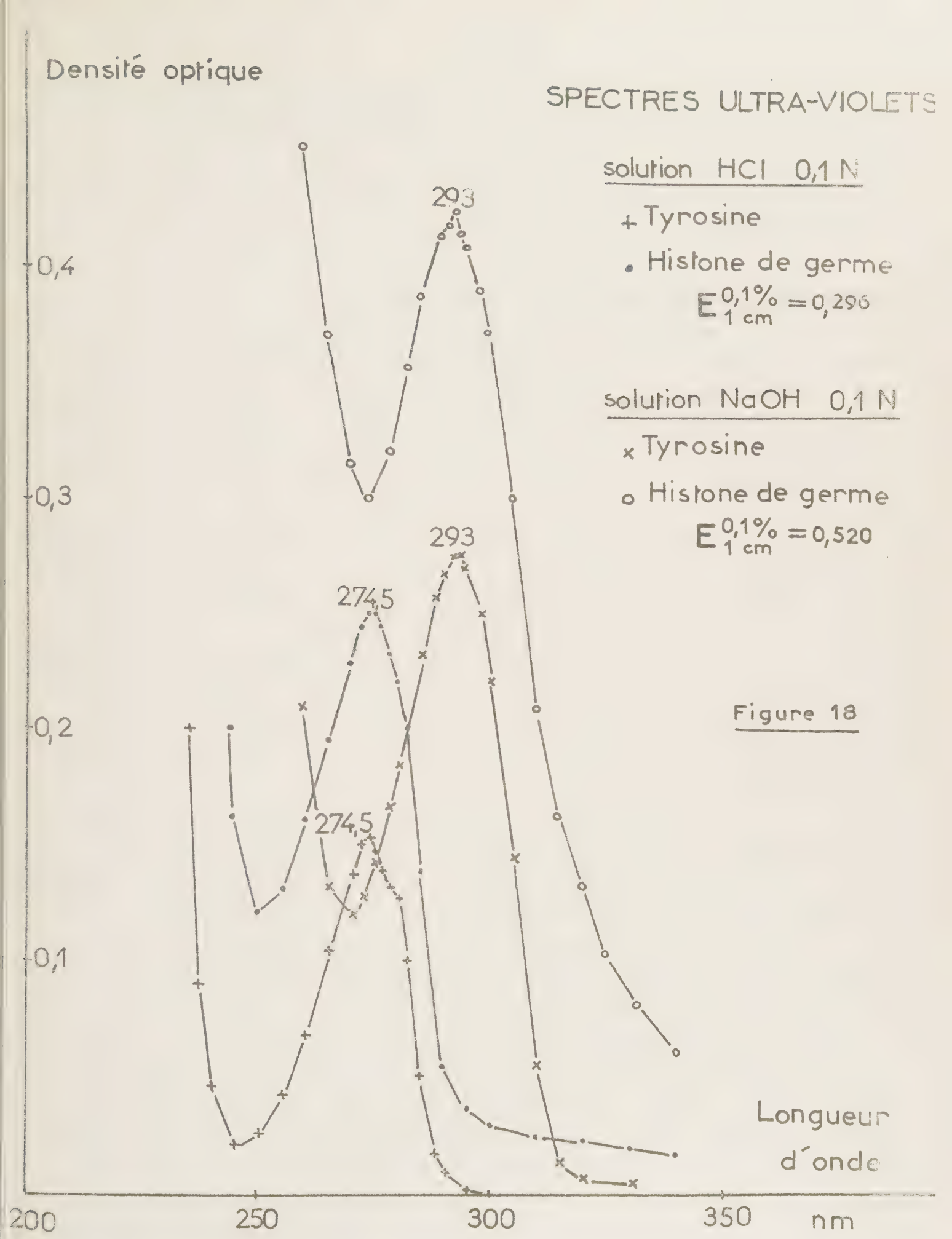

Densité optique
SPECTRES ULTRA-VIOLETS
solution HCl 0,1 N
+ Tyrosine
. Histone de germe
$E^{0,1\%}_{1\,cm} = 0,296$
solution NaOH 0,1 N
x Tyrosine
o Histone de germe
$E^{0,1\%}_{1\,cm} = 0,520$
293
293
274,5
274,5
0,4
0,3
0,2
0,1
200
250
300
350
nm
Longueur d'onde

Figure 18

Les coefficients d'extinction apparaissent très proches, pour les deux protéines étudiées, y compris avec la réaction de FOLIN qui est pourtant le résultat d'une réaction de biuret et d'une réaction spécifique de la tyrosine et du tryptophane. Contrairement à la mesure de l'absorption UV, cette dernière réaction permet donc un dosage sensible de l'histone, comme plusieurs auteurs ont pu le constater (HENSON et WALKER, 1970; OH, 1970).

3.2.3 - Les protéines résiduelles de la D.N.P.:

Les protéines résiduelles de la DNP apparaissent difficilement séparables de l'ADN, ce qui explique le faible nombre de travaux les concernant.

Contrairement à DERUMEZ et al. (1968), qui font état d'une extraction sélective à partir de DNP de thymus au moyen de soude diluée (après isolement préalable de l'histone), nous n'avons pu réaliser l'opération du fait que NaOH 0,1 N entraîne une dissolution simultanée de la quasi totalité de l'ADN.

En revanche, nous avons pu isoler des protéines résiduelles par simple déprotéinisation du résidu d'extraction de l'histone, au moyen de chloroforme-octanol (5 : 1) (principe de SEVAG). Cela a permis de vérifier le caractère électronégatif de cette protéine (migration vers l'anode à pH 3,2) (fig. 19).

La composition en acides aminés de la protéine résiduelle totale a été déterminée par analyse du résidu d'extraction de l'histone, en admettant que les produits d'hydrolyse de l'ADN ne perturbent pas la séparation des acides aminés. Le tableau 8 fournit ainsi l'analyse comparée de l'histone, de la protéine résiduelle et de la nucléohistone de germe.

Si on établit par le calcul la composition de la DNP à partir des analyses concernant respectivement histone (80 %) et protéine résiduelle (20 %), on constate que les taux d'acides aminés obtenus sont en très bon accord avec la composition de la DNP directement analysée (tableau 8).

Cette concordance confirme à nouveau les proportions respectives déjà mentionnées en histone et en protéine résiduelle et laisse supposer qu'il n'y a pas interférence de l'ADN dans les analyses.

Le tableau 8 met d'autre part en évidence de nettes différences entre la protéine résiduelle et l'histone du germe, notamment pour les taux de glycocolle, proline, alanine et lysine, ainsi que pour le rapport lysine/arginine (0,76 pour la protéine résiduelle, 1,86 pour l'histone). Pour ce qui concerne la protéine résiduelle, celle de germe présente un caractère basique (rapport basiques/acides = 1,34) alors que celle de thymus manifeste un caractère acide (basiques/acides =0,67). En outre, on ne détecte pas de cystéine et de méthionine dans la protéine du germe alors que ces acides aminés sont présents dans celle du thymus.

On pourrait penser que cette différence de composition provient d'une

Tableau 8: Composition en acides aminés de l'histone, de la nucléohistone et de la protéine résiduelle du germe de blé: (en moles pour 100 moles des acides aminés présents).

| | Histone | Protéine résiduelle | Nucléo-histone | Nucléo-histone (calculée) | Protéine résiduelle de thymus de veau (DERUMEZ et al., 1968) |
|---|---|---|---|---|---|
| Acide aspartique A | 4,5 | 5,7 | 4,8 | 4,7 | 10,3 |
| Thréonine | 5,6 | 4,2 | 5,5 | 5,3 | 6,6 |
| Sérine | 4,4 | 4,1 | 4,2 | 4,3 | 10,1 |
| Acide glutamique A | 7,6 | 8,5 | 7,7 | 7,7 | 16,0 |
| Proline | 7,5 | 3,6 | 6,0 | 6,7 | 5,2 |
| Glycocolle | 8,0 | 25,5 | 12,9 | 12,5 | 11,3 |
| Alanine | 13,0 | 8,3 | 12,7 | 12,1 | 10,7 |
| Valine | 5,9 | 5,9 | 6,2 | 5,9 | 6,6 |
| Cystéine | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,4 |
| Méthionine | tr. | 0 | 0 | 0 | 1,7 |
| Isoleucine | 5,1 | 4,0 | 4,9 | 4,9 | 4,8 |
| Leucine | 8,1 | 6,7 | 7,5 | 7,8 | 10,0 |
| Tyrosine | 2,1 | 1,3 | 1,9 | 1,9 | 3,1 |
| Phénylalanine | 2,4 | 3,1 | 2,3 | 2,5 | 3,7 |
| Lysine ) | 15,3 | 7,1 | 13,0 | 13,7 | 9,2 |
| Histidine ) B | 1,8 | 2,6 | 1,9 | 1,9 | 2,0 |
| Arginine ) | 8,2 | 9,3 | 8,2 | 8,4 | 6,4 |
| Lys / Arg | 1,86 | 0,76 | 1,59 | 1,63 | 1,44 |
| Acides A | 12,1 | 14,2 | 12,5 | 12,4 | 26,3 |
| Basiques B | 25,3 | 19,0 | 23,1 | 24,0 | 17,6 |

contamination de la protéine résiduelle de germe par de l'histone non totalement extraite, notamment par les fractions riches en arginine plus fortement liées à l'ADN. Nous ne le pensons pas, car d'éventuelles histones résiduelles seraient extraites par déprotéinisation au chloroforme-octanol et apparaîtraient sur le diagramme de la protéine résiduelle (fig. 19), ce qui n'est pas le cas. Il faudrait donc admettre que chez le germe, la protéine résiduelle présente un caractère basique plus faible que l'histone, alors qu'au contraire, la protéine correspondante du thymus est nettement acide

Enfin, contrairement à certains travaux du domaine animal qui nient l'existence de protéine résiduelle et considèrent que cette fraction n'est qu'une histone plus fortement liée à l'ADN, nos résultats semblent mettre en évidence dans la DNP, une protéine réellement différente de l'histone, sur le plan de la charge électrique et de la composition en acides aminés. En revanche, la question de savoir si les liaisons, probablement du type covalence, entre la protéine résiduelle et l'ADN sont natives ou sont le résultat du traitement acide de la DNP (SONNENBICHLER et NOBIS, 1970) reste à élucider.

### 3.2.4 - Constitution protéique des histones.

Compte tenu du faible nombre des travaux antérieurs se rapportant à la question, une large étude systématique du fractionnement de l'histone de germe a été entreprise et la plupart des techniques classiques, analytiques et préparatives (extractions sélectives, précipitations sélectives, gel-filtration, chromatographie d'échange d'ions,...) ont été examinées.

Parmi les plus favorables, nous avons retenu deux schémas de fractionnement, complémentaires l'un de l'autre:

1) Analyse électrophorétique de l'histone, en gels d'amidon et de polyacrylamide.

2) Fractionnement préparatif par précipitation sélective et/ou chromatographie d'échange d'ions.

#### 3.2.4.1 - Fractionnement analytique de l'histone:

##### a) Electrophorèse en gel d'amidon:

Comme cela ressort de travaux antérieurs relatifs aux histones animales (NEELIN et CONNEL, 1959; JOHNS et al., 1961; LURRAY, 1969), le gel d'amidon n'apparait pas idéal pour fractionner les histones, probablement du fait de sa trop grande polarité. Les diagrammes de la figure 20 a obtenus dans les conditions classiques de SMITHIES (1955), relatifs au germe et au thymus, semblent cependant bien caractéristiques des histones. Ils font apparaitre des différences qualitatives de constitution: zone rapide non dédoublée chez le germe mais dédoublée chez le thymus.

Comme le montre le diagramme de la figure 20 b, l'incorporation de chlorure d'aluminium au gel (à une dose de 0,6 m M %), proposée par HNILICA et al. (1966), conduit à un accroissement de la distance de migration et une amélioration de la résolution, bien qu'on ignore si le dédoublement de la plupart des zones est réellement significatif.

L'électrophorèse des histones en gel d'amidon, avec les divers inconvénients qu'elle implique, ne semble donc pas offrir toutes les possibilités souhaitables. C'est pourquoi nous avons préféré, dans la plupart des cas, choisir le gel de polyacrylamide comme technique de référence.

b) Electrophorèse en gel de polyacrylamide:

$b_1$) Examen critique de la technique utilisée:

Bien que la quasi totalité des travaux sur les histones utilisent l'électrophorèse verticale en tubes, nous avons préféré la technique horizontale en plaques. Celle-ci nous parait en effet plus propice à la comparaison d'un grand nombre d'échantillons testés simultanément sur un même diagramme. Si par ailleurs, l'étude des histones animales de constitution assez simple, est relativement aisée en tubes, celle des histones isolées du blé fournit des diagrammes plus complexes et moins facilement interprétables.

Les conditions que nous avons retenues (§ 2.4.1.2) constituent une adaptation de la technique de PANYIM et CHALKLEY (1969) avec plusieurs modifications rendant possible l'électrophorèse en plaques. Nous avons vérifié en particulier:

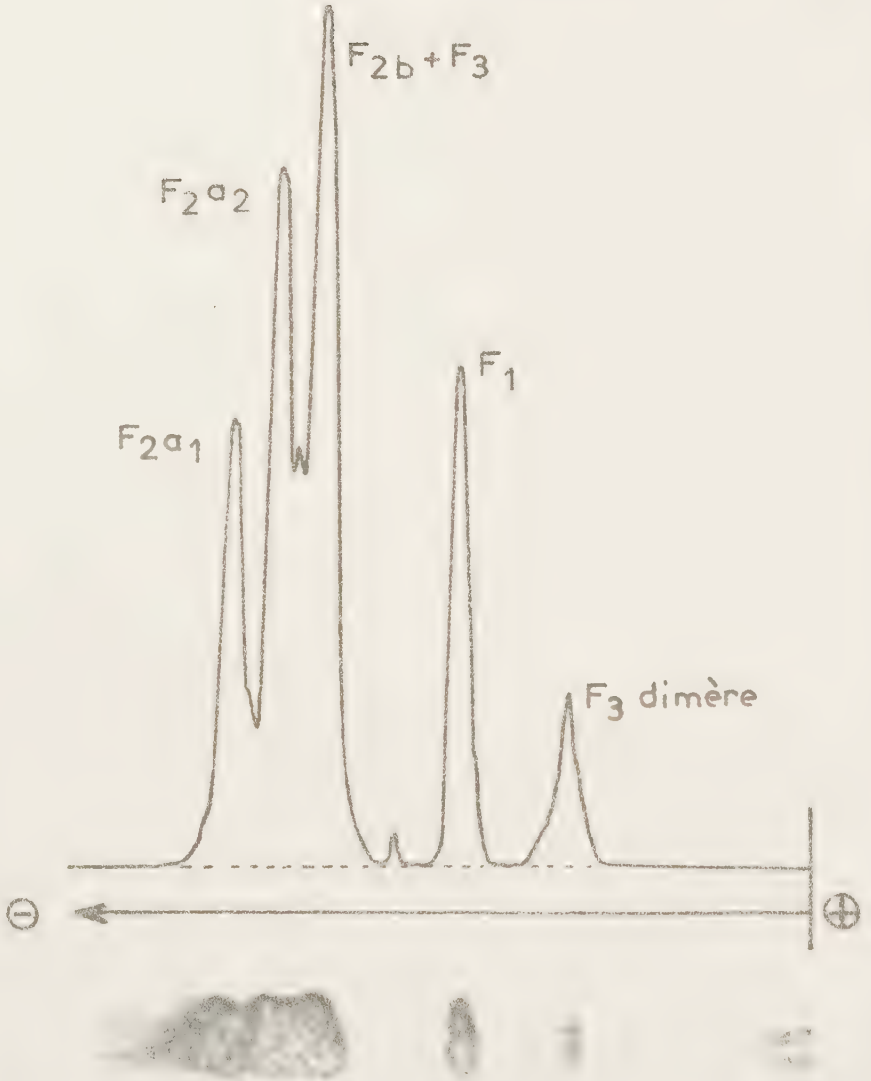
- qu'une immersion du gel pendant une nuit dans l'acide acétique 0,9 N accroissait la mobilité et améliorait la résolution des bandes,
- qu'en modifiant la teneur en NN' - méthylène bis acrylamide (0.5 % au lieu de 0,1 %), on évitait un gonflement excessif du gel au cours de l'immersion,
- qu'une forte concentration en urée (6,25 M) était nécessaire pour obtenir une séparation fine et éviter l'apparition d'artefacts et la rétention au point de dépôt,
- qu'un précourant, permettant l'élimination complète de certains ions ($S_2O_8^{--}$), améliorait la résolution des bandes.

$b_2$) Constitution comparée des histones de germe de blé et de thymus de veau:

La figure 21 fournit les diagrammes d'une histone de germe et d'une histone de thymus, obtenus par la technique d'électrophorèse précédemment exposée.

# DENSITOGRAMMES DES FRACTIONNEMENTS ELECTROPHORETIQUES

HISTONE DE THYMUS DE VEAU




HISTONE DE GERME DE BLE

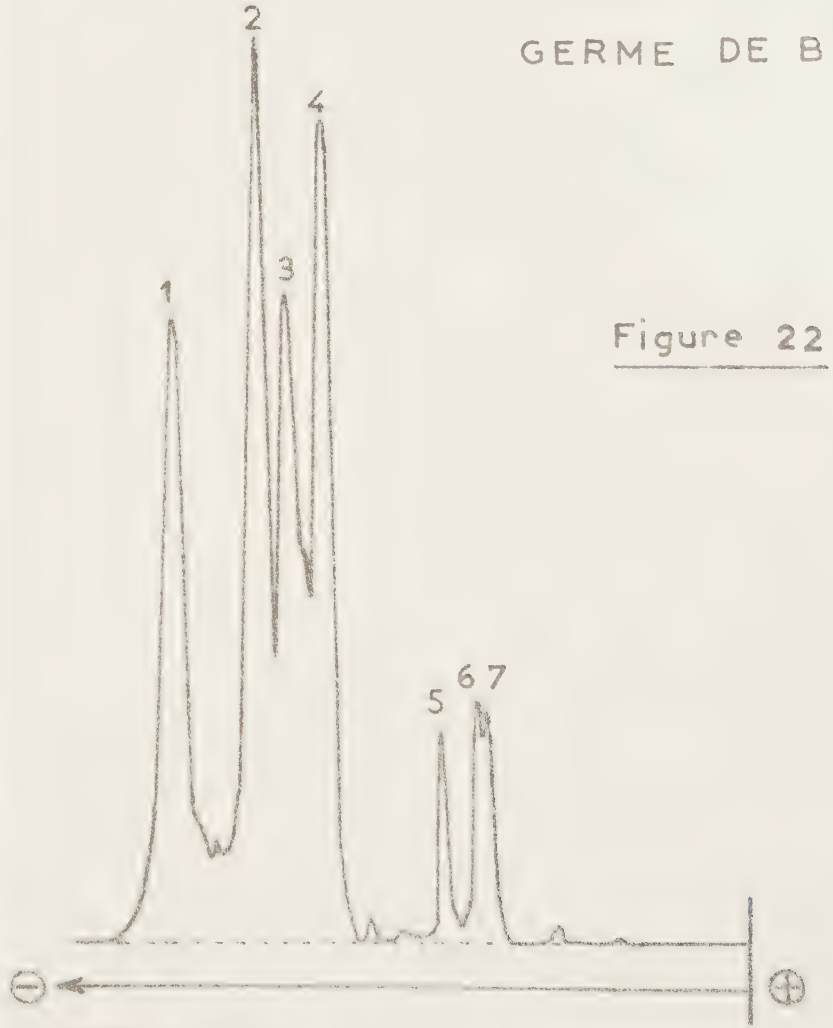



Figure 22

Comparé aux résultats observés en gel d'amidon, on constate que le fractionnement et la résolution des composants sont nettement améliorés, montrant ainsi l'avantage du polyacrylamide pour fractionner les protéines du type histone.

En outre, les différences entre les histones de germe et de thymus, très atténuées en gel d'amidon, deviennent ici évidentes. Celle de thymus donne, en effet, un diagramme comportant 4 - 5 composants principaux, identique à celui obtenu par PANYIM et CHALKLEY (1969). Nous avons donc pu lui appliquer la nomenclature de JOHNS et al. (1960) et identifier ainsi respectivement les fractions $F_2a_1$, $F_2a_2$, $(F_2b + F_3)$, $F_1$ et $F_3$ dimère, par ordre de mobilité décroissante.

Le diagramme de l'histone de germe présente une constitution très différente, à l'exception de la bande la plus mobile qui semble commune aux deux histones. Nous avons donc provisoirement numéroté les composants de 1 à 7, par ordre de mobilité décroissante. L'analyse des acides aminés apportera certaines précisions sur les caractéristiques de ces fractions.

La proportion relative des différents composants a été déterminée par densitométrie des diagrammes électrophorétiques des deux histones (fig. 22 Toutefois, les proportions relatives obtenues par intégration des pics d'absorption ne sont qu'approximatives, car la coloration des bandes à l'amido-schwarz varie sensiblement de l'une à l'autre, comme l'indique le tableau 9.

Tableau 9: Densitométrie comparée des diagrammes d'histones de germe et de thymus:

| Germe de blé | | | Thymus de veau | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Bande | % de l'histone totale | Coloration | Fraction | % de l'histone | Coloration |
| 1 | 21,4 | bleu-foncé | $F_2a_1$ | 16,2 | bleu-foncé |
| 2 | 24,5 | bleu-vert | $F_2a_2$ | 21,8 | bleu-vert |
| 3 | 18,1 | bleu | $F_3 + F_2b$ | 33,5 | bleu |
| 4 | 17,6 | bleu | $F_1$ | 17,6 | gris-bleu |
| 5 | 6,6 | gris-bleu | $F_3$ dimère | 6,2 | turquoise |
| 6 | 5,5 | gris-bleu | | | |
| 7 | 5,5 | gris-bleu | | | |

Cette relative spécificité de coloration des complexes formés par l'amido-schwarz et les différentes protéines, vaguement signalée par NEELIN et NEELIN (1960) et CRUFT (1962), pourrait être liée à certains types de composition en acides aminés des fractions séparées. L'identification des bandes électrophorétiques apparait donc possible selon un second critère, s'ajoutant à celui de la mobilité. On observe ainsi l'analogie entre $F_2a_1$ du thymus et la bande 1 du germe (bleu foncé), entre $F_2a_2$ et 2 (bleu vert) ainsi qu'entre $F_1$ et (5-6-7) (gris bleu) (tableau 9).

On note enfin, qu'à côté des 7 bandes principales de l'histone de germe, des composants présents à l'état de trace et dont la mobilité n'est pas constante, apparaissent parfois. Il pourrait s'agir soit de faibles quantités de contaminants, soit de fractions d'histone ayant subi une modification, notamment par désacétylation ou désamination, ce qui peut conduire à des composants de mobilité différente et non reproductible (PALLOTTA et BERLOWITZ, 1970). A l'exception de deux bandes lentes, dont nous tenterons d'expliquer l'origine (cf. § 3.3.3), nous avons négligé ces traces de protéines du fait que les 7 constituants principaux rassemblent toujours plus de 95 % de l'absorption totale du diagramme.

Dans l'ensemble, l'histone de germe apparait donc formée de 3 groupes de constituants:

- un groupe de faible mobilité (0,355 à 0,425. $10^{-4}$ $cm^2$ $volt^{-1}$ $sec^{-1}$) représentant environ 20 % de l'histone totale,
- un groupe intermédiaire, prédominant (0,585 à 0,675. $10^{-4}$ $cm^2$ $volt^{-1}$ $sec^{-1}$): 60 % de l'histone totale,
- une bande frontale (0,795. $10^{-4}$ $cm^2$ $volt^{-1}$ $sec^{-1}$) représentant 20 % environ de l'histone totale.

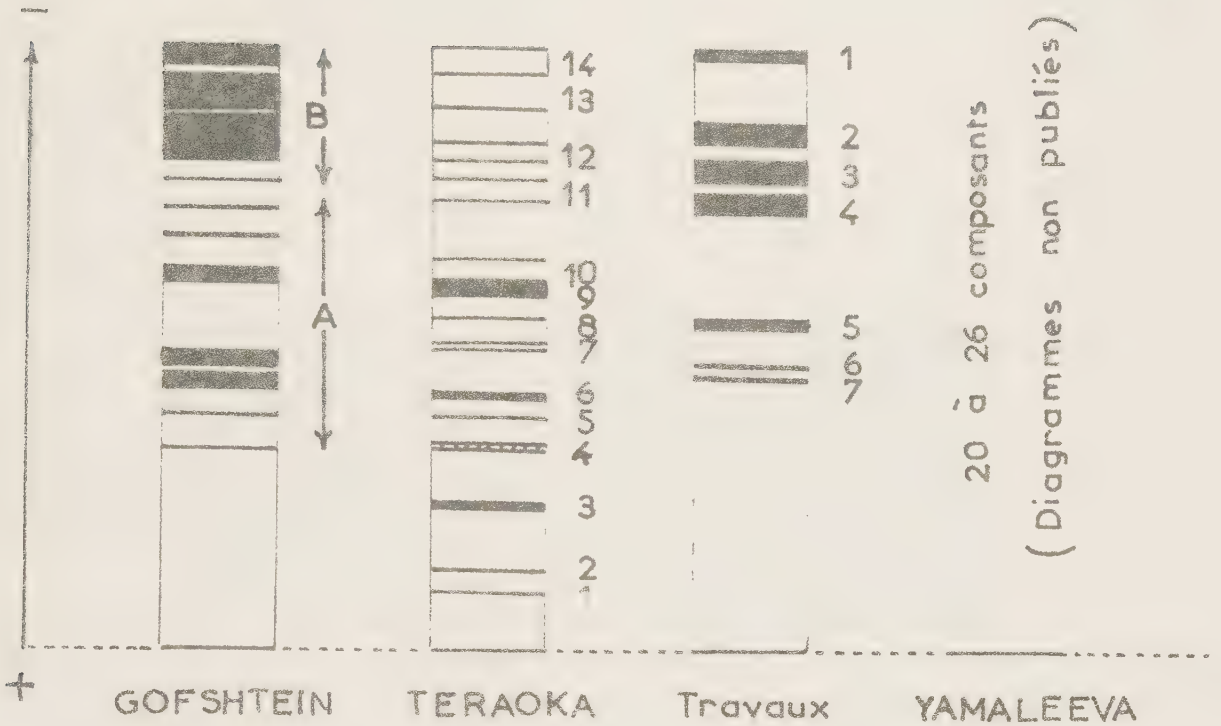
### $b_3$) Constitution comparée de l'histone de germe de blé, selon différents travaux:

Peu d'auteurs ont procédé antérieurement au fractionnement électrophorétique (gel de polyacrylamide) de l'histone du germe de blé. L'étude comparative de ces travaux apparait délicate car les conditions expérimentales utilisées sont généralement différentes.

Néanmoins, pour donner une idée des divers résultats obtenus pour cette protéine du germe, nous avons reproduit (fig. 23) les schémas des diagrammes présentés par les auteurs comparativement aux nôtres, en précisant les conditions expérimentales correspondantes.

Cette figure a été obtenue en schématisant les photographies des diagrammes de GOFSHTEIN (1967, 1968) et les nôtres. Par contre, pour les résultats de TERAOKA (1968) qui, comme de nombreux auteurs, ne fournit pas de photographie originale, nous reproduisons le schéma publié.

# SCHEMAS DES DIAGRAMMES D'ELECTROPHORESE DE L'HISTONE DE GERME SELON DIFFERENTS AUTEURS




| | GOFSHTEIN 1967, 1968 | TERAOKA 1968 | Travaux personnels. | YAMALEEVA 1970 |
|---|---|---|---|---|
| Concentration en acrylamide | 15 | 7,5 | 15 | 15 |
| pH du gel | 2,9 | 4,5 | 3,2 | 3,2 |
| Urée | 0 | 4 M | 6,25 M | 6,25 M |

Figure 23

Enfin, YAMALEEVA (1970), qui a travaillé sur les histones de plantules de blé, ne publie pas de diagramme mais fait seulement état de 20 à 26 composants électrophorétiques.

Cette comparaison met en évidence de profondes différences de constitution, pour la même histone de germe, entre différents auteurs. Il faut cependant considérer que les conditions d'extraction puis de fractionnement des protéines ne sont pas les mêmes.

Ayant bénificié de l'expérience analytique plus récente de PANYIM et CHALKLEY (1969) dans ce domaine, les résolutions dans les diagrammes que nous avons obtenus sont très sensiblement améliorées et permettent ainsi des interprétations plus rigoureuses.

Jusqu'à une époque relativement récente, de nombreux auteurs considéraient encore les histones comme constituées de 15 à 20 fractions. Les remarquables travaux de BUTLER et al. (1968), FAMBROUGH et BONNER (1969), PANYIM et CHALKLEY (1969), ont montré au contraire, que le nombre des composants réellement histones était très limité et toujours de l'ordre de 7 à 10. Les autres fractions décelées antérieurement ne correspondaient vraisemblablement qu'à des artefacts de préparation ou à des contaminants (protéines ribosomales).

Par ailleurs, comme nous le mettons en évidence (cf. fig. 21 et fig. 30), à partir de l'histone classique qu'est celle du thymus de veau, nos diagrammes coincident parfaitement avec ceux de PANYIM et CHALKLEY (1969) et PANYIM et al. (1971).

Il ne nous est donc pas possible d'expliquer l'existence des 20 à 26 composants signalés par YAMALEEVA qui a appliqué, sans modifications, la même technique.

### 3.2.4.2 - Fractionnement préparatif de l'histone de germe de blé:

L'objectif poursuivi ici est l'isolement des principaux composants de l'histone, en vue d'une étude physico-chimique de ceux-ci. Peu de travaux similaires ont été entrepris dans le domaine végétal et, à l'exception de ceux de FAMBROUGH et BONNER (1968) sur le pois, aucun ne fait état d'un fractionnement préparatif et d'une caractérisation de l'ensemble des fractions de l'histone.

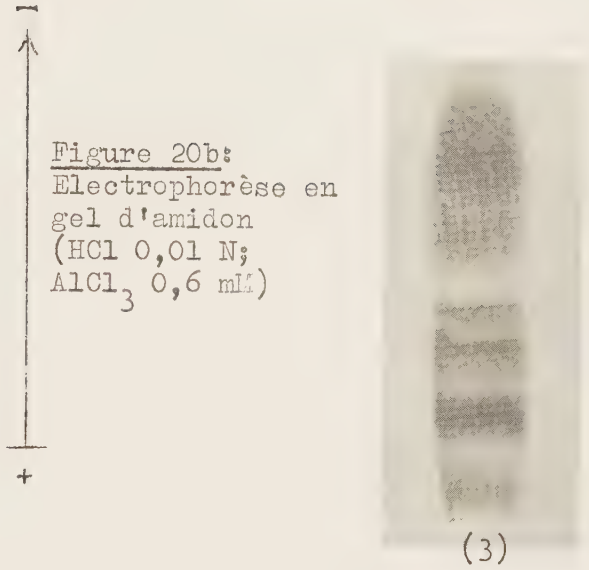
Une étude systématique préalable s'imposait donc. Pour ce faire, nous avons été amenés à appliquer au germe de blé, différentes idées inspirées de travaux sur l'histone de thymus, par exemple:

- l'extraction sélective à partir de la DNP au moyen d'acide forts de pH décroissants (MURRAY, 1966, 1969), d'acide perchlorique 5 % (JOHNS, 1964), d'acide citrique (DAVISON et al., 1954).

- la précipitation sélective par l'acétone ou l'éthanol

Figure 20a:
Electrophorèse en gel d'amidon (HCl 0,01 N)

Figure 20b:
Electrophorèse en gel d'amidon (HCl 0,01 N; $AlCl_3$ 0,6 mM)




Diagrammes d'une histone de germe (1) et (3) et d'une histone de thymus de veau (2).

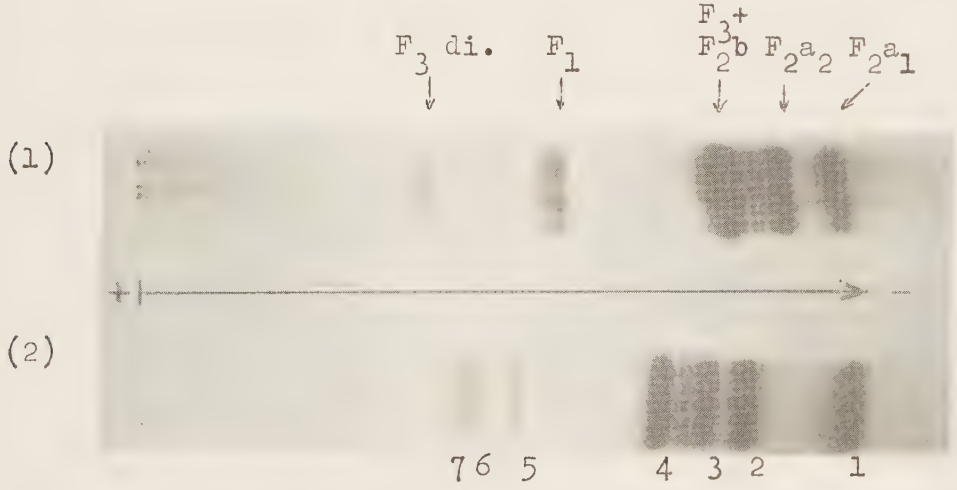



Figure 21: Diagrammes électrophorétiques en gel de polyacrylamide à pH 3,2 d'une d'une histone de thymus de veau (1) et d'une histone de germe de blé (2).

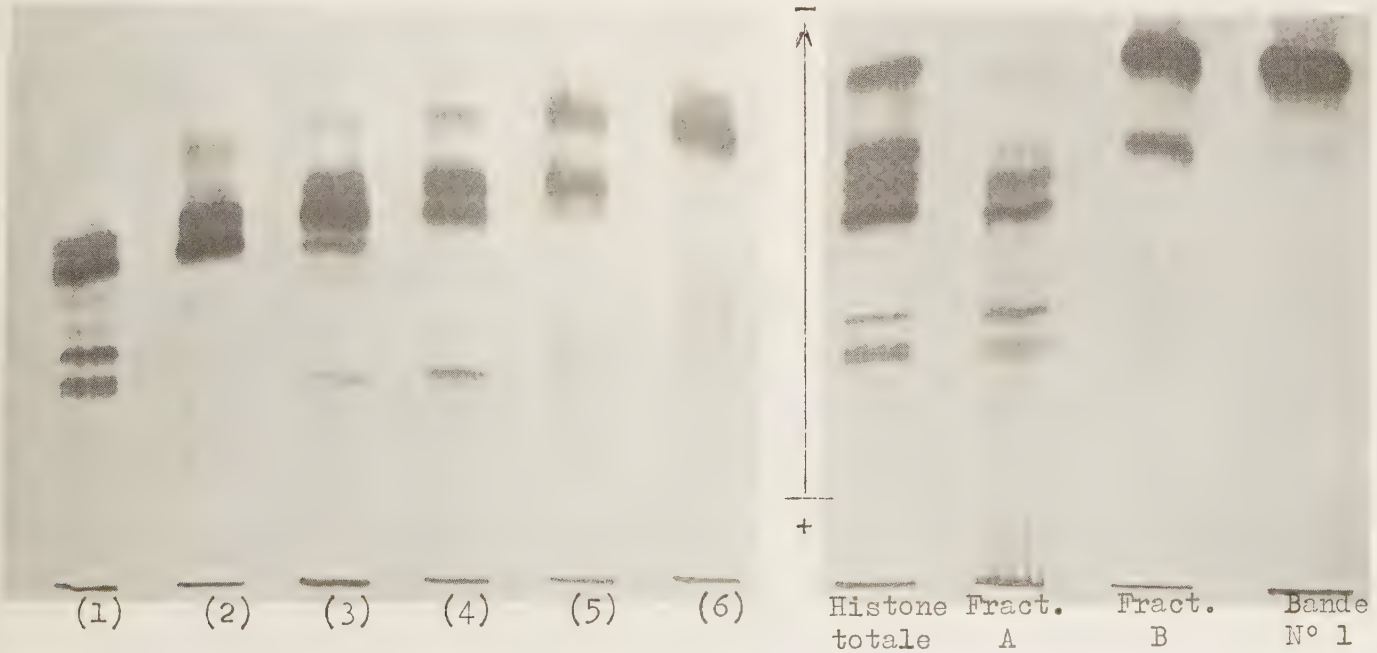



Figure 24: Précipitation sélective de l'histone par addition d'acétone (volumes successifs:

Figure 25: Fractionnement de l'histone de germe par précipitation à

(UI, 1957; JOHNS, 1964; PHILLIPS et JOHNS, 1965), l'acide trichloracétique (LUCK et al., 1958), l'ammoniaque (DAVISON et al., 1954).

- la chromatographie d'échanges d'ions: CMcellulose-acétate (JOHNS et al., 1960), CMcellulose-formiate (JOHNSON et al., 1964).

- la chromatographie de gel-filtration: Sephadex G-75 (CRUFT, 1961); Bio-Gel P 60 (HNILICA et BESS, 1965).

Il nous est impossible de détailler ici les nombreuses observations effectuées lors de l'application de ces divers procédés. Aussi nous bornerons-nous à faire état uniquement de ceux susceptibles d'être retenus pour parvenir à un isolement préparatif des principaux composants de l'histone:

- la précipitation sélective par l'acétone
- la chromatographie sur CMcellulose.

a) Précipitation sélective par l'acétone:

Alors que l'éthanol ne permet qu'une précipitation totale de l'histone (en milieu $H_2SO_4$), nous avons observé que l'acétone, en milieu HCl, opérait une précipitation sélective de fractions différentes.

La figure 24 montre ainsi que les précipités successifs obtenus par addition progressive d'acétone, c'est-à-dire de caractère hydrophobe croissant, correspondent à des composants électrophorétiques de mobilité également croissant.

On constate qu'il faut jusqu'à 8 volumes d'acétone pour précipiter la bande 1 frontale; le caractère particulièrement hydrophobe de cette fraction expliquerait qu'elle soit parfois absente de certaines préparations d'histones isolées selon ce procédé (JOHNS et BUTLER, 1962a; NAKAGAKI et HIRAI, 1967; SPELSBERG et SARKISSIAN, 1968). Par ailleurs, dans les précipités par 4 et 4,5 volumes d'acétone, on observe la présence d'une bande moyenne; celle-ci étant absente des précipités à 3,5 volumes est probablement différente des fractions 6-7 de mobilité analogue, elles-mêmes précipitées à 3 volumes.

En utilisant le mode de fractionnement appliqué à l'histone de germe par JOHNS et BUTLER (1962b) et GOFSHTEIN (1968) (précipitations successives à 5 volumes, puis 11,5 volumes d'acétone), nous avons pu identifier avec précision les fractions isolées. Ainsi, 5 volumes d'acétone en milieu HCl précipitent un composant A (75 % de l'histone totale) constitué des bandes 2 à 7; 6,5 volumes supplémentaires permettent d'isoler un composant B (25 % de l'histone totale) correspondant aux bandes 1 et 2.

Nous avons pu, en outre, après purification de cette fraction B, compléter son fractionnement en isolant à l'état pur le composant N° 1 (fig.25

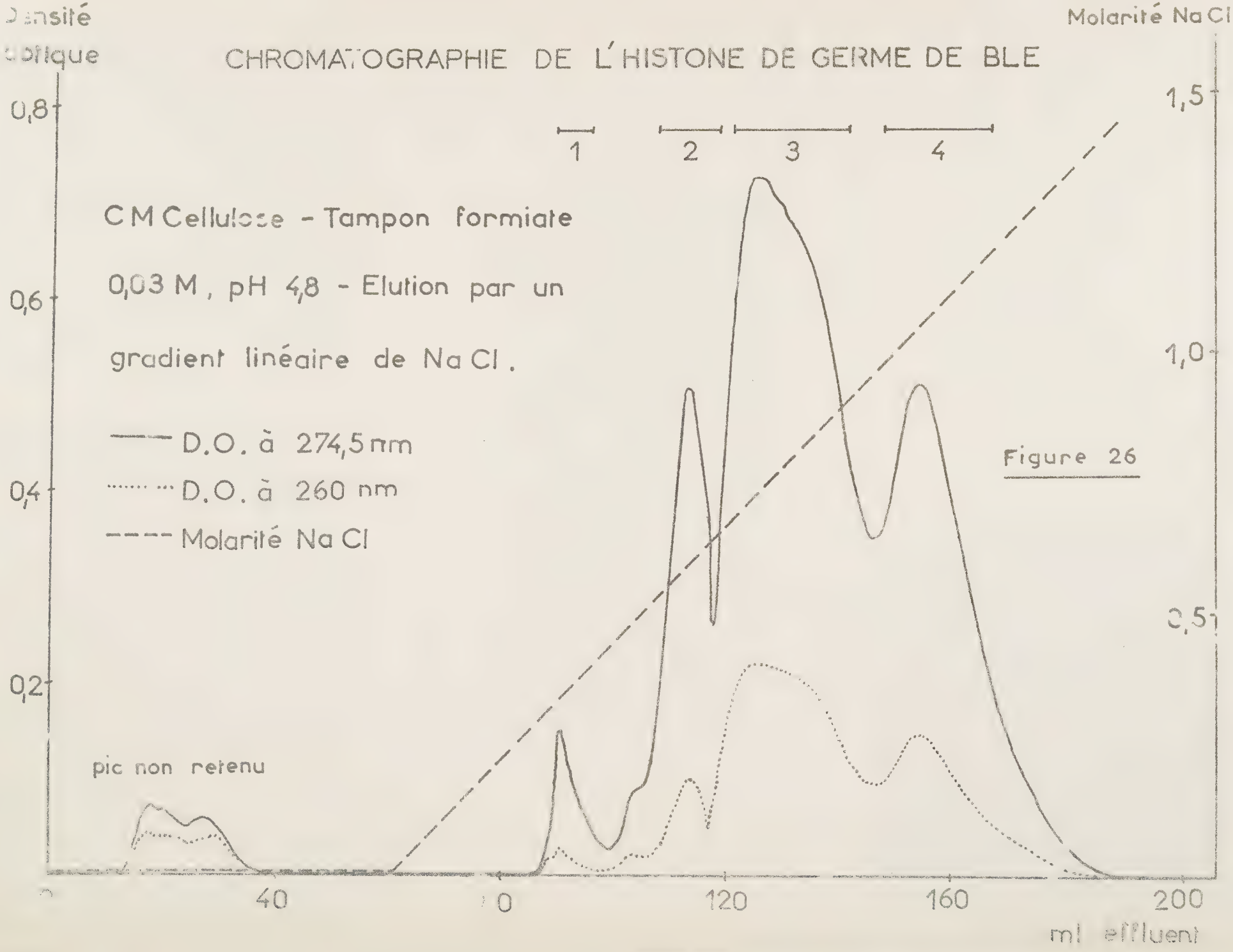
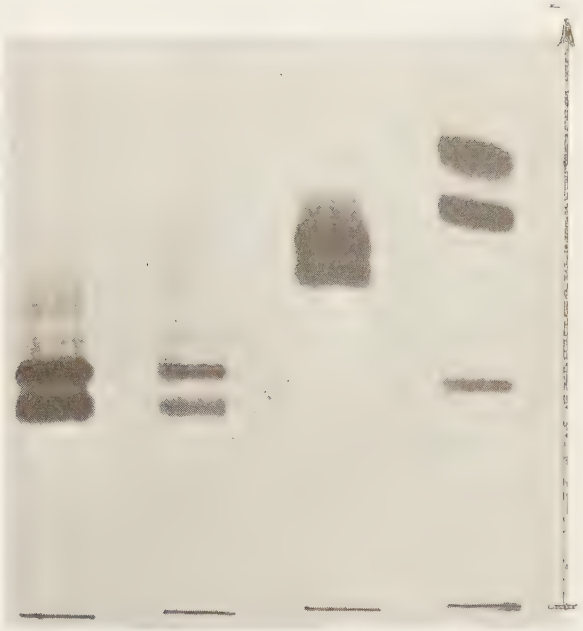

Densité optique
Molarité Na Cl
CHROMATOGRAPHIE DE L'HISTONE DE GERME DE BLE
0,8
0,6
0,4
0,2
1,5
1,0
0,5
1
2
3
4
C M Cellulose - Tampon formiate
0,03 M, pH 4,8 - Elution par un
gradient linéaire de Na Cl.
D.O. à 274,5 nm
D.O. à 260 nm
Molarité Na Cl
pic non retenu
40
80
120
160
200
ml effluent

Figure 26



(1) (2) (3) (4)

Figure 27: Analyse électrophorétique des 4 pics obtenus par chromatographie sur CM cellulose. (1, 2, 3, 4 : numéros des pics).

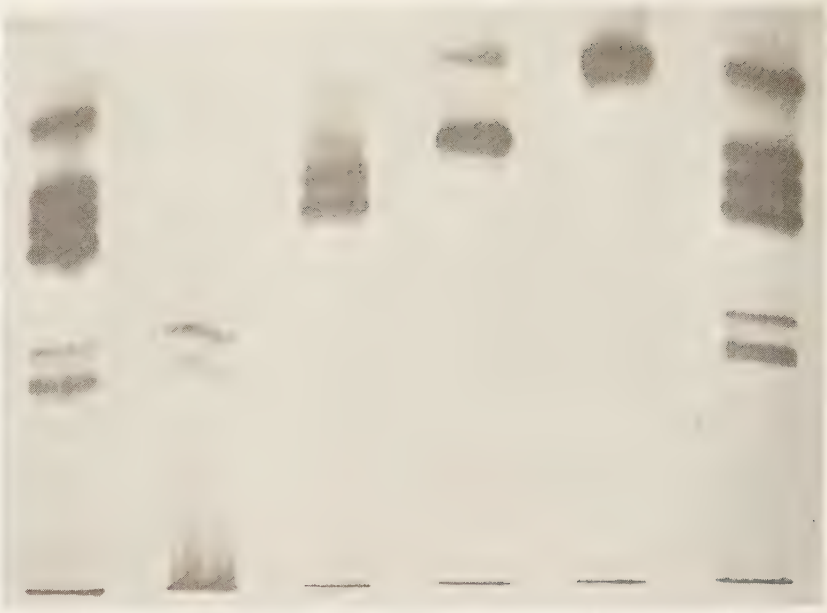


Figure 28 b: Diagramme électrophorétique en gel de polyacrylamide des 4 principaux composants de l'histone de germe.

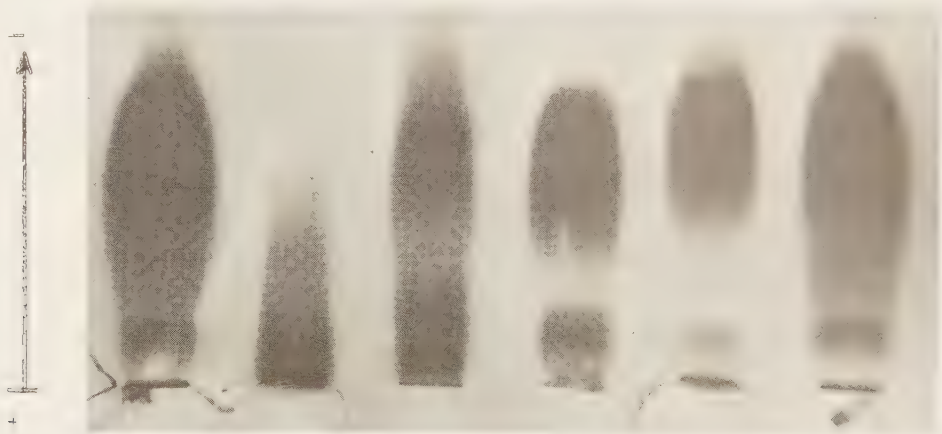


Figure 28 a: Diagramme électrophorétique [illegible]

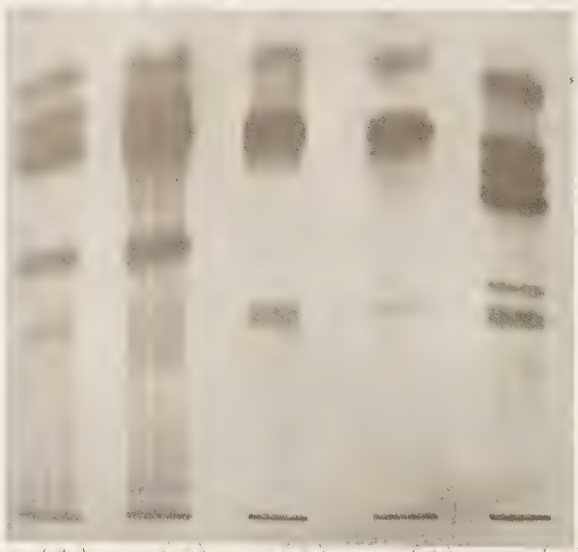


Figure 41: Possibilité de dénaturation du constituant n° 2:

(1) Histone de thymus, oxydée
(2) Histone de thymus, réduite
(3) Constituant n° 2 de germe, oxydé
(4) Constituant n° 2 de germe, réduit
(5) Histone totale de germe, témoin

b) Chromatographie d'échanges d'ions:

La carboxyméthylcellulose (CMC), échangeur d'ions dont l'emploi est très simple, permet d'opérer aux pH acides nécessités par le fractionnement des histones.

La technique très classique utilisée dans ce domaine (élution par des solutions HCl de pH croissants) (JOHNS et al., 1960) ne s'est cependant pas avérée satisfaisante: les 3 pics obtenus, bien séparés, ont tous en effet la même constitution électrophorétique que l'histone initiale. Ceci confirme les observations de JOHNS et BUTLER (1962b) selon lesquelles les 3 pics observés ont des compositions en acides aminés identiques.

Nous avons donc retenu une technique fondée sur un autre principe: élution par un gradient de concentration NaCl (0 à 2 M) en milieu formiate 0,03 M à pH 4,8 (JOHNSON et al., 1964). Contrairement aux résultats de ces auteurs qui, à partir de l'histone de thymus font état de 7 pics (dont les différences de constitution apparaissent peu significatives), la figure 26 montre que l'histone de germe se décompose en 4 pics, dont l'analyse électrophorétique s'avère intéressante (fig. 27).

Si le premier pic ne semble être qu'un agrégat du second, les pics 2, 3 et 4 correspondent respectivement aux bandes 5 - 6 - 7, 3 - 4 et 1 - 2. Dans ce dernier pic, on note la présence d'une bande moyenne migrant au niveau de 6 - 7, mais ne pouvant être due à une traînée, puisqu'absente du pic 3. Il pourrait donc s'agir d'une protéine de même charge électrique que les bandes 1 - 2, mais de masse moléculaire plus élevée.

On a également noté une particularité des bandes 5 - 6 - 7 qui, pour précipiter de leur solution, nécessitent des concentrations en acide trichloracétique nettement plus élevées (15 à 18 %) que les autres bandes (8 à 10 %).

Les proportions relatives des 4 pics observés sont fournies dans le tableau suivant:

| N° du pic | Composition | Récupération (mg/100 mg d'histone déposés) | |
|---|---|---|---|
| 1 | bandes 5-6-7 | 1,5 | 84,6 |
| 2 | " 5-6-7 | 15,2 | |
| 3 | " 3-4 | 31,6 | |
| 4 | " 1-2 | 36,3 | |

Ainsi, il nous a été possible d'isoler à une échelle préparative, trois groupes distincts de composants histones dans des conditions de récupération satisfaisantes pour ce type d'échangeur d'ions.

### 3.2.4.3 - Propriétés physico-chimiques des principaux composants de l'histone de germe:

Au moyen des techniques de fractionnement et d'isolement décrites § 2.4.3, qui conjuguent la précipitation sélective à l'acétone et la chromatographie sur CMcellulose, il a été possible de préparer les composants principaux de l'histone, dans un état de pureté satisfaisant.

Nous avons ainsi pu disposer, en quantités de l'ordre de quelques dizaines de milligrammes, des fractions N° 1, 2, 3-4 et 5-6-7 (fig. 21). Nous n'avons cependant pas cherché à fractionner les groupes 3-4 et 5-6-7 du fait de la très grande analogie des propriétés physico-chimiques de leurs propres constituants.

En vue de préciser l'apparentement des fractions ainsi isolées à certains composants classiques tels que $F_1$, $F_2a$, etc... des histones végétale ou animales, plusieurs types d'analyses (constitution électrophorétique, acides aminés, spectres UV) ont été effectués. Cependant, pour faciliter les comparaisons, nous avons jugé utile d'anticiper sur les conclusions de ce chapitre (cf. § 3.2.5.c) en assimilant respectivement les fractions 1, 2, 3-4, 5-6-7, aux fractions de la nomenclature classique: $F_2a_1$, $F_2a_2$, $F_2b$ et $F_1$. Nous justifierons plus loin cette anticipatic

#### a) Constitution électrophorétique:

Les figures 28a et 28b fournissent les diagrammes électrophorétiques, respectivement en gel d'amidon et en gel de polyacrylamide, des 4 composants isolés de l'histone de germe, comparativement à la protéine totale. On y trouve également le diagramme d'une histone reconstituée par mélange des 4 constituants, selon les proportions déterminées par intégration du densitogramme (cf. tableau 12). L'identité apparente des histones initiale et reconstituée permet de penser que les différentes opérations d'isolement n'ont pas visiblement modifié les fractions protéiqu

En revanche, la correspondance des zones observées en gel d'amidon avec les bandes visibles en acrylamide apparait délicate. On constate en effet que la zone frontale observée en amidon, rassemble en réalité plusieurs composants (1 à 4) résolus en acrylamide. Par ailleurs, les zones lentes semblent s'identifier aux constituants 5-6-7, mais les composants 1 à 4, réexaminés en gel d'amidon, présentent également des zones faiblement mobiles.

Compte tenu des travaux antérieurs (FAMBROUGH et BONNER, 1969; PANYIM et CHALKLEY, 1969), nous pensons que les bandes histones uniques observées en acrylamide correspondent à un seule entité protéique. Puisqu'une même bande, redéposée en gel d'amidon, se subdivise en plusieurs zones, il faut admettre que les conditions d'emploi du gel d'amidon (forte polarité, impossibilité d'opérer en présence de fortes concentrations d'urée) entraînent, avec les histones, la formation d'artefacts et notamment d'agrégats de faible mobilité.

# SPECTRES ULTRA-VIOLETS DES FRACTIONS DE L'HISTONE DE GERME DE BLE

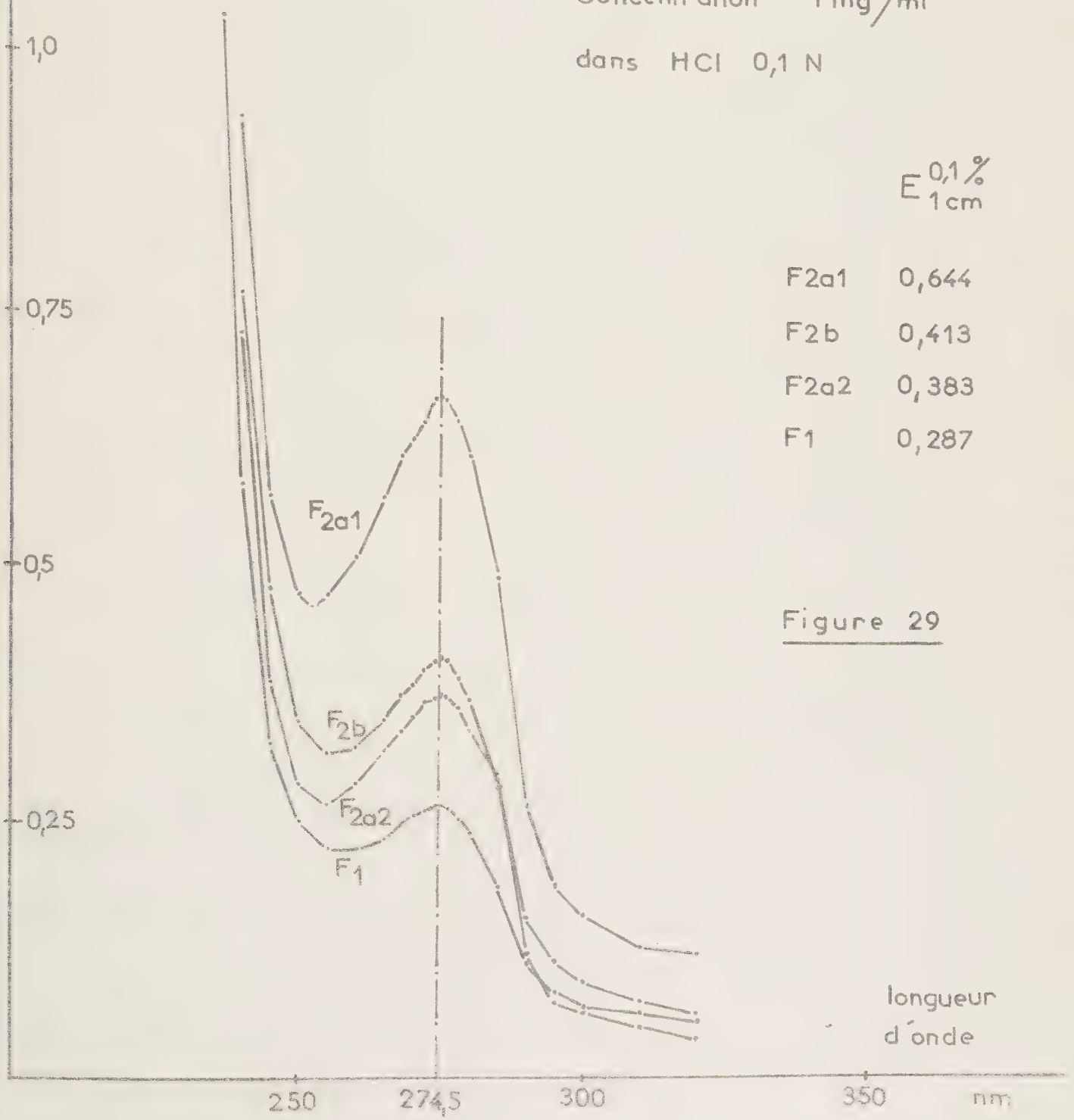



Figure 29

b) Composition en acides aminés:

Le tableau 10 reproduit les compositions en acides aminés des 4 fractions isolées, comparativement à celle d'une histone totale.

Contrairement aux 5 fractions classiques ($F_1$, $F_2a_1$, $F_2a_2$, $F_2b$ et $F_3$) des histones de pois et de thymus, qui possèdent chacune une composition très caractéristique (notamment au niveau du rapport lysine/arginine qui varie de 15 pour $F_1$ à 0,7 pour $F_3$), on observe ici une différenciation relativement faible des composants.

Seules les bandes 1 et 2 apparaissent réellement "riches en arginine", tandis que les bandes 3 à 7 pourraient être classées dans le type "faiblement riche en arginine" et ne sauraient être distinguées sur la base du rapport lysine/arginine.

Selon ce même critère, JOHNS et BUTLER (1962 b) et GOFSHTEI (1968) n'ont pu en effet obtenir que 2 fractions distinctes à partir de l'histone de germe dont les rapports lysine/arginine étaient respectivement de 2,3 et 1,3.

Les modes de fractionnement préparatif de l'histone que nous avons retenus aboutissent toutefois à des informations plus complètes. Ils mettent ainsi en évidence:

- l'originalité des bandes 5-6-7 quant au rapport basiques/acides, nettement plus élevé que chez les autres fractions,
- un classement des composants par ordre de polarité relative croissante: 2, 1, 3-4 et 5-6-7.

De plus, l'examen des taux de certains acides aminés permet de caractériser les différentes fractions:

- la bande 1 apparait relativement riche en glycocolle, valine, tyrosine et pauvre en sérine, proline et alanine, ce qui est très caractéristique du type $F_2a_1$.
- la bande 2 est riche en acide glutamique et en leucine.
- le groupe 3-4 apparait riche en sérine et alanine.
- le groupe 5-6-7 se distingue par ses taux élevés en proline, alanine, faibles en acide aspartique, acide glutamique, glycocolle, valine, isoleucine, leucine, tyrosine et par l'absence de méthionine, qui sont des caractères typiques des fractions $F_1$.

On observe enfin, qu'aucune fraction isolée ne présente les caractères du type classique $F_3$. Toutefois, la bande 2 possède une teneur assez élevée en acide glutamique et apparait la seule à contenir des traces de cystéine.

Tableau 10: Composition en acides aminés (en moles d'acide aminé pour 100 moles des acides aminés présents) de 4 fractions de l'histone de germe de blé.

| | Histone totale de germe de blé | Bande 1 type "$F_2a_1$" ou GAR-histone | Bande 2 type "$F_2a_2$" ou ALR-histone | Bandes 3-4 type "$F_2b$" ou SLR-histone | Bandes 5-6-7 type "$F_1$" ou VLAR-histone |
|---|---|---|---|---|---|
| Acide aspartique A | 4,5 | 5,6 | 4,2 | 5,5 | 3,8 |
| Thréonine | 5,6 | 6,4 | 6,0 | 5,5 | 6,3 |
| Sérine | 4,4 | 2,7 | 4,2 | 6,2 | 5,4 |
| Acide glutamique A | 7,6 | 7,4 | 9,0 | 8,0 | 5,5 |
| Proline | 7,5 | 2,0 | 5,8 | 6,8 | 9,7 |
| Glycocolle | 8,0 | 13,8 | 8,6 | 7,7 | 6,8 |
| Alanine | 13,0 | 8,2 | 12,5 | 14,1 | 19,8 |
| Valine | 5,9 | 8,9 | 6,0 | 6,7 | 5,4 |
| Cystéine | 0 | 0 | tr. | 0 | 0 |
| Méthionine | tr. | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0 |
| Isoleucine | 5,1 | 6,4 | 5,5 | 5,4 | 3,4 |
| Leucine | 8,1 | 8,4 | 9,1 | 6,6 | 5,8 |
| Tyrosine | 2,1 | 3,9 | 2,1 | 2,1 | 1,4 |
| Phénylalanine | 2,4 | 2,7 | 3,4 | 2,5 | 2,2 |
| Lysine | 15,3 | 8,2 | 9,4 | 14,8 | 16,3 |
| Histidine B | 1,8 | 2,1 | 2,1 | 1,9 | 1,9 |
| Arginine | 8,2 | 12,8 | 11,6 | 5,6 | 5,7 |
| Lys / Arg | 1,86 | 0,64 | 0,81 | 2,64 | 2,86 |
| Acides A | 12,1 | 13,0 | 13,2 | 13,5 | 9,3 |
| Basiques B | 25,3 | 23,1 | 23,1 | 22,3 | 23,9 |
| B / A | 2,09 | 1,78 | 1,75 | 1,65 | 2,57 |
| Polaires (*) | 45,6 | 43,1 | 44,4 | 45,7 | 43,0 |
| Apolaires (**) | 29,0 | 28,8 | 30,2 | 28,5 | 26,5 |
| Pol. / Apol. | 1,57 | 1,50 | 1,47 | 1,60 | 1,62 |

(*) Acides aminés polaires: Asp, Thré, Sér, Glut, Lys, Arg.

(**) Acides aminés apolaires: Pro, Val, Méth, Ileu, Leu, Phé.

c) Spectres ultra-violets:

La figure 29 présente les spectres ultra-violets des 4 fractions d'histone, pour une concentration protéique de 0,1 %. Si l'allure des 4 courbes reste la même, avec un maximum d'absorption vers 274,5 nm, le coefficient d'extinction varie nettement d'un type à l'autre, depuis $E^{0,1\ \%}_{1\ cm} = 0,644$ pour la bande 1 ($F_2a_1$) jusqu'à 0,287 pour le type 5-6-7 ($F_1$).

Ce résultat est en parfait accord avec les teneurs en acides aminés aromatiques trouvées, notamment en tyrosine (3,0 % pour $F_2a_1$ et 1,4 % pour $F_1$) et confirme aussi pleinement les travaux similaires sur des histones de thymus (PIERI et al., 1968; OH, 1970).

3.2.5 - Relations entre les histones du germe de blé et d'autres histones végétales et animales :

Les conditions d'extraction et de fractionnement que nous avons utilisées ont permis de mettre en évidence plusieurs propriétés physico-chimiques de l'histone totale de germe et de ses différents composants. Pour chacun de ceux-ci, les observations effectuées permettent de mettre en évidence certaines analogies avec différentes fractions d'histone d'origines végétales ou animales et de discuter sur les différences et les points communs éventuels.

Pour la clarté de l'exposé, nous indiquerons préalablement (fig. 30), comparativement à nos propres résultats, les schémas des diagrammes électrophorétiques empruntés à plusieurs travaux relatifs aux histones végétales (blé, seigle, pois) et à une histone animale (thymus).

a) Propriétés physico-chimiques des composants:

En soumettant les DNP à des extractions acides de pH décroissants (fig. 14), on a mis en évidence les différences d'affinités pour l'ADN des diverses fractions. L'ensemble des composants N°s 3 à 7 est ainsi apparu peu retenu sur l'ADN contrairement au N° 2 et surtout au N° 1 qui semble le plus fortement lié.

Le caractère hydrophobe apparait d'autre part plus ou moins marqué, comme l'ont souligné les précipitations successives de l'histone par l'acétone (fig. 24). L'apolarité semble ainsi croître selon l'ordre suivant des fractions: N° 5-6-7; N° 3; N° 2; N° 1.

La charge électrique nette des composants, mise en évidence (fig. 27) par chromatographie d'échanges d'ions, fait apparaître 3 groupes distincts: 5-6-7 (peu chargé); 3-4 (intermédiaire); 1-2 (fortement chargé).

Enfin, le fractionnement électrophorétique (gel de polyacrylamide) (fig. 28b), qui fait ressortir le rapport e/m de la charge nette e à la masse moléculaire m, permet de classer les composants dans l'ordre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (selon un rapport e/m décroissant).

b) Analogies des composants avec des fractions classiquement décrites:

Des observations précédentes, il ressort, pour chaque type de composant, un ensemble de propriétés particulières, permettant d'opérer des rapprochements avec des types classiques de fractions d'histones animales et végétales.

- Composant N° 1:

De tous les composants de l'histone, c'est celui qui présente la plus forte apolarité ainsi que la plus forte affinité pour l'ADN. Il est, par ailleurs, aussi chargé que le N° 2, mais semble posséder une plus faible masse moléculaire que ce dernier, vu sa mobilité électrophorétique.

Ces propriétés tendent à souligner la très grande analogie du composant N° 1 avec le type classique riche en glycocolle et arginine $F_2a_1$, dénommé histone IV selon la nomenclature de LUCK et al. (1958), ou encore GAR-histone. Cette analogie semble d'autre part confirmée par la composition en acides aminés (presque identique à celle de l'histone IV de thymus), la mobilité électrophorétique et la coloration à l'amido-schwarz, identiques à celles du composant animal homologue.

Nous pensons donc que ces premiers résultats relatifs au germe de blé renforcent ceux de l'équipe de BONNER qui, les premiers, ont démontré la quasi-identité de la structure primaire de l'histone IV entre les organismes aussi éloignés que le pois et le veau. Cette propriété remarquable a d'ailleurs été étendue très récemment aux histones IV de différents tissus normaux et néoplasiques de plusieurs organismes animaux (SAUTIERE et al., 1971).

- Composant N° 2:

Riche en arginine et en lysine, ce composant apparait relativement apolaire, assez fortement lié à l'ADN et proche du type $F_2a_1$, d'autant que sa charge électrique est la même. Il s'en distingue néanmoins par une mobilité électrophorétique plus faible (qui traduit donc une masse moléculaire plus importante) et une composition particulière en acides aminés, notamment pour la proline et le glycocolle. Ces caractéristiques l'apparentent donc davantage à l'autre fraction du groupe $F_2a$, c'est-à-dire $F_2a_2$ (ALR-histone).

Cependant, l'analogie avec cette fraction signalée dans différents travaux est moins étroite que pour le composant N° 1: malgré une même coloration à l'amido-schwarz, on remarque en effet que la mobilité électrophorétique diffère (figure 21) entre la bande 2 du germe et le type $F_2a_2$ du thymus. Cela s'accorde également avec plusieurs résultats antérieurs (MANDAL, 1969; PANYIM et al., 1971) ayant montré certaines dissemblances au niveau de ce composant entre des histones d'organismes différents. Ainsi, entre le thymus de veau et le pois, $F_2a_2$ possèderait des caractéristiques similaires mais non identiques (FAMBROUGH et BONNER, 1966). Il semblerait donc en être de même entre le germe de blé et le thymus de veau.

Par ailleurs, le composant 2 du germe apparait souvent accompagné d'une fraction de mobilité moyenne. En outre, l'importance quantitative de cette fraction augmente par oxydation (contact de la solution protéique à l'air et au froid durant 18 heures) et inversement, diminue par réduction (séjour de 18 heures dans du béta-mercaptoéthanol 1 M) (fig. 31) au profit du composant N° 2. Cela suggère donc qu'une fraction de l'histone de germe (le type $F_2a_2$ lui-même, ou peut-être un composant mineur de mobilité égale, donc non visible) puisse exister soit sous forme monomère (réduite) soit sous forme dimère (oxydée). La présence de traces de cystéine (tableau 10) dans l'analyse du composant 2 vient à l'appui de cette hypothèse.

Des observations similaires ont été rapportées par FAMBROUG et BONNER (1968) et SMITH et al (1970) à propos des fractions $F_3$ (seuls composants des histones à renfermer normalement de la cystéine) qui sont susceptibles de donner un dimère (cas du pois) ou plusieurs polymères (cas du thymus) par oxydation de la cystéine en cystine.

Chez le germe, le trop faible taux en cystéine du composant 2 semble indiquer que celui-ci n'est pas lui-même impliqué dans le mécanisme d'oxydo-réduction. Il pourrait donc seulement s'agir d'une trace de fraction du type $F_3$, sensible à l'oxydo-réduction comme celles des histones de thymus ou du pois, et qui sous forme monomère contaminerait le composant 2. Dans cette hypothèse, il est alors intéressant de noter que cette fraction $F_3$ monomère présumée, présente la même mobilité électrophorétique que son homologue du thymus (fig. 31), mobilité qui coïnciderait fortuitement avec celle du type $F_2a_2$ de germe. Cela viendrait également à l'appui des résultats de FAMBROUGH et BONNER (1969) et de PANYIM et al. (1971) qui font état d'une conservation de la mobilité du composant $F_3$ entre des organismes différents.

Le composant classique $F_3$, que l'on trouve dans toutes les histones animales et certaines histones végétales, pourrait donc n'exister qu'à l'état de traces, peu visibles dans l'histone totale, chez le germe de blé. La forme dimère correspondante expliquerait la présence d'un composant de mobilité moyenne que nous avons observé précédemment dans les fractions contenant l'histone $F_2a_2$ (pic 4 de chromatographie: § 3.2.4.2 b) et précipité par 4,5 volumes d'acétone: § 3.2.4.2 a).

- Composants N° 3 - 4:

Ils apparaissent relativement riches en lysine (lys/arg = 2, et en sérine, et de caractère nettement polaire. Leur composition en acides aminés, leur mobilité électrophorétique et leur dédoublement suggèrent une analogie avec le type classique $F_2b$ ($F_2b_1$ et $F_2b_2$) ou SLR-histone. Selon la nomenclature de LUCK et al. (1958), ils correspondraient au type IIa, dédoublé en $IIa_1$ et $IIa_2$, comme chez de nombreux végétaux (alors que chez les histones animales $F_2b$ n'est pas dédoublé et constitue, avec $F_2a_2$, le groupe IIb).

- Composants 5 - 6 - 7:

Ce groupe apparait à la fois le moins chargé électriquement (élution dans les pics 1 et 2 de CMC; faible mobilité électrophorétique), le plus polaire (précipitation par seulement 3 volumes d'acétone) et le moins lié à l'ADN (extraction dès pH 2). Toutefois, ces deux derniers caractères ne permettent pas de le distinguer nettement du groupe 3-4 précédent. L'originalité des composants 5-6-7 semble porter essentiellement sur une masse moléculaire élevée et sur une charge électrique relativement faible, ce que laissent apparaître leurs comportements électrophorétiques et chromatographiques très spécifiques.

Nous avons noté, en outre, la composition en acides aminés particulière (taux d'acide glutamique, de proline et d'alanine), la coloration gris-bleu à l'amido-schwartz et la précipitation vers seulement 15 - 18 % d'acide trichloracétique.

Cet ensemble de caractères permet d'apparenter les composants 5-6-7 au type classique très riche en lysine et alanine (VLAR-histone) $F_1$ (plus exactement ici $F_1a$, $F_1b$, $F_1c$, encore appelés respectivement Ia, Ib, Ic). Cependant, la dénomination habituelle "très riche en lysine" de ce groupe n'apparait pas justifiée chez le germe, car le rapport lys/arg n'est que de 2,86 au lieu de 10 - 15 chez les autres histones: (thymus, pois, fève,..).

Les composants 5-6-7 de germe semblent donc constituer un groupe de type $F_1$ dont les caractéristiques classiques seraient atténuées. Cela explique la difficulté de les isoler séparément des fractions $F_2b$, contrairement à ce qui a lieu pour d'autres histones (MANDAL et al., 1971). En outre, le faible rapport e/m qui semble caractériser ce large groupe $F_1 + F_2b$, pourrait expliquer, en accord avec l'hypothèse de PHILLIPS (1961), sa faible affinité pour l'ADN.

c) Conclusions:

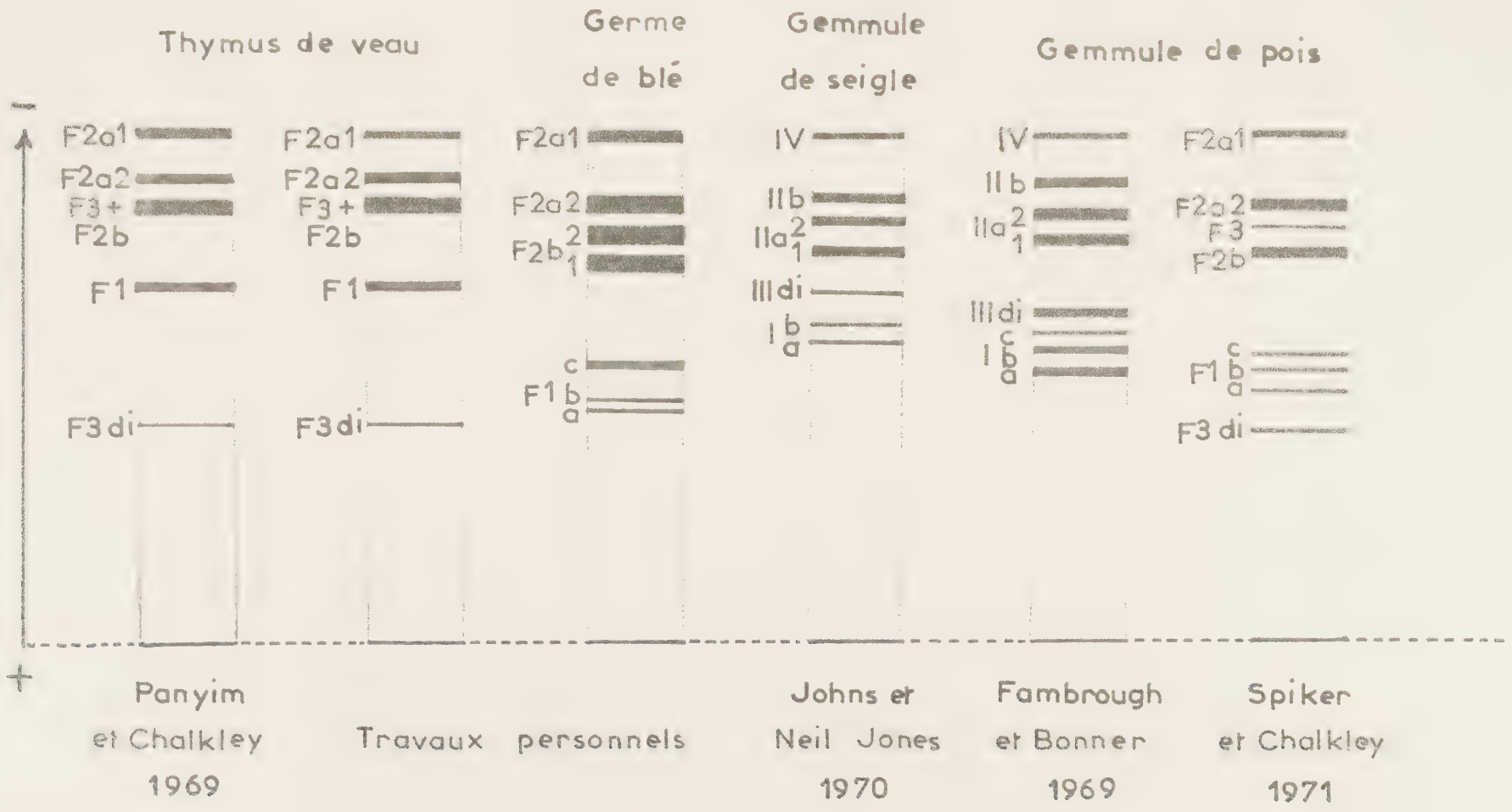
On peut retenir des observations précédentes que l'histone totale de germe présente à la fois des analogies et des dissemblances avec les autres histones. Parmi les analogies, nous avons noté:

- un caractère acido-soluble (prédominance des acides aminés basiques, rapport lys/arg = 1,86).
- une absence quasi-totale de tryptophane et d'acides aminés soufrés.
- la présence de composants du type $F_1$, $F_2a$, $F_2b$, plus ou moins proches des fractions habituellement décrites.
- une hétérogénéité limitée (7 bandes) en électrophorèse, analogue à celle rapportée par la plupart des autres travaux, comme cela ressort des schémas de la figure 30.

En revanche, plusieurs dissemblances ont été mises en évidenc

# SCHEMAS DES DIAGRAMMES ELECTROPHORETIQUES DE QUELQUES HISTONES ANIMALES ET VEGETALES

Figure 30



- aucun composant majeur ne semble s'apparenter au type classique $F_3$ très fortement lié à l'ADN. Cette anomalie confirme les observations antérieures de JOHNS et BUTLER (1962 b) et explique plusieurs propriétés particulières de l'histone de germe (solubilité élevée en milieu apolaire: 65 % d'éthanol ou d'acétone) (§ 3.2.2.1), absence de précipitation au pH isoélectrique (§ 3.2.2.1), extraction aisée à partir de la DNP (§ 3.2.1.1). Nous avons cependant noté la présence possible d'un faible composant de type $F_3$, sous forme monomère ou dimère, de mobilité analogue à celui du thymus.

- il n'apparaît pas de composant $F_1$ très différencié, mais plutôt un large groupe englobant les types $F_1$ et $F_2b$, que l'extraction ou la précipitation sélectives ne peuvent fractionner.

- une telle atténuation des composants classiques les plus originaux, explique les multiples échecs notés lors de la transposition directe des protocoles de fractionnement mis au point pour d'autres histones (extraction sélective selon JOHNS (1964); CMcellulose, selon JOHNS et al. (1960).

Dans l'ensemble, bien que présentant une complexité électrophorétique du même ordre, ou parfois plus grande, que celle de ses homologues animales et végétales, l'histone de germe apparaît donc faiblement différenciée sur le plan de ses propriétés physico-chimiques.

Comment expliquer cette originalité? Contrairement à BUTLER et al. (1968), nous ne pensons pas qu'il faille l'attribuer au caractère embryonnaire du germe, car les histones d'embryon de pois (FAMBROUGH et BONNER, 1968) et de riz (IWAI, 1964) apparaissent normalement différenciées. Il ne semble pas non plus s'agir d'un caractère spécifique des céréales, car les histones de seigle (JOHNS et NEIL JONES, 1970) et de riz (KOBAYASHI et al., 1963 ; IWAI, 1964) apparaissent de type classique. Il semble donc encore difficile de faire le lien entre ces quelques observations du fait d'un trop faible nombre de travaux ayant abordé l'étude des histones végétales sous l'angle physico-chimique.

Dans l'ensemble, cependant, malgré l'originalité de l'histone de germe de blé, l'idée qui se dégage est celle d'une relative similarité avec les protéines homologues des autres organismes végétaux et même animaux.

Bien que les composants de type $F_1$ puissent être responsables d'une certaine spécificité, les fractions $F_2a_1$ et $F_3$ sont, elles, remarquablement stables. Elles constituent un exemple sans précédent d'absence de modification évolutive et devaient donc exister sous leur forme actuelle avant l'apparition de l'ordre des mammifères et même du règne animal.

Globalement, les histones apparaissent donc comme les protéines peu évolutives, ce qui permet de penser que la totalité de leur structure est indispensable à leur activité biologique. Toute hypothèse visant à élucider cette activité biologique devra donc nécessairement tenir compte de cette caractéristique exceptionnelle.

## 2ème PARTIE ASPECT PHYSIOLOGIQUE DE LA CONSTITUTION DES HISTONES DU GRAIN DE BLE.

Les différentes observations rassemblées dans la première partie, principalement au niveau de la constitution protéique des histones, ont été appliquées à l'étude de différents problèmes intéressant la physiologie du grain de blé.

L'intérêt de cet aspect se justifie par le rôle actuellement attribué aux histones au niveau du contrôle de l'expression des gènes.

Les modifications qualitatives ou quantitatives éventuellement apportées à la constitution de telles protéines au cours des transformations physiologiques qui affectent le grain de blé sont susceptibles, en effet, de fournir indirectement de précieuses informations sur la fonction des histones elles-mêmes ou de certains de leurs composants.

C'est pourquoi, notre étude a porté sur deux phases importantes du développement de la plante, la germination et la maturation du grain, au cours desquelles l'activité de nombreux gènes est certainement modifiée.

Comme cela nous imposait de travailler généralement sur le grain lui-même et non plus sur le seul germe, une étude préalable des DNP et des histones du grain total était nécessaire, ce qui nous a amenés à déterminer la répartition de ces constituants protéiques dans les différents tissus du grain (albumen, régions périphériques, enveloppes, germe) et à préciser dans le cas de l'albumen, les relations entre les histones et les groupes protéiques initialement définis par OSBORNE (1907).

Enfin, il était intéressant de connaître l'influence éventuelle de quelques facteurs externes (lieu de culture, fertilisation) et des caractéristiques génétiques (différentes variétés et espèces de blés, comparativement à quelques autres genres de céréales).

## 3.3 - ETUDE DES D.N.P. ET DES HISTONES DE DIFFERENTS TISSUS DU GRAIN

### 3.3.1 - Répartition des composés nucléiques dans le grain de blé:

Avant de procéder à des tentatives d'isolement des DNP et histones à partir des différents tissus du grain, des études quantitatives visant à déterminer le taux de ces composés, dans ce matériel beaucoup plus complexe que le germe, s'imposait. Nous avons tenté de résoudre ce problème par l'intermédiaire du dosage des acides nucléiques. En particulier, nous avons considéré la détermination de l'ADN comme un moyen de déceler les DNP et de donner une idée de leur importance relative.

Ces données ont pu être établies par analyse de plusieurs produits de la mouture semi-industrielle du blé, dont chacun correspond grossièrement à une région du grain (cf.§ 2.1.4). Ces différents matériels sont cependant complexes, du fait de leur richesse en composés de réserve insolubles (amidon, cellulose, pentosanes, protéines de réserve), ce qui rend particulièrement délicates les opérations d'extraction quantitatives et de dosage des acides nucléiques.

Cela explique que parmi 8 techniques classiques préalablement testées 4 seulement aient pu conduire à des résultats significatifs (cf. § 2.2.2). Nous ne reviendrons pas sur la discussion du choix de ces techniques, celle-ci ayant été précédemment rapportée (AUTRAN et BOURDET, 1971 b), mais nous examinerons d'emblée les résultats.

Le tableau 11 fournit ainsi les teneurs trouvées en ARN et en ADN pour les différentes "régions" du grain (variété Cappelle), selon les 4 méthodes retenu

Ces résultats montrent que les écarts entre les valeurs obtenues par des méthodes de principes très divers, sont relativement faibles (4 à 7 % par rapport aux valeurs moyennes), ce qui permet de considérer ces valeurs moyennes comme significatives. On remarque, en outre, que le germe est respectivement 12 et 20 fois plus riche en acides nucléiques que le grain entier et la farine. Cette richesse du germe, notamment en ADN, en faisait donc un matériel de base particulièrement intéressant pour aborder l'étude des DNP et des histones du grain, et pour la mise au point des techniques d'isolement et de fractionnement destinées à être appliquées ultérieurement aux autres matériels.

Le tableau 12 exprime les teneurs moyennes en acides nucléiques par rapport au grain entier, compte tenu des proportions relatives des différentes "régions" Il apparaît ainsi que l'albumen, pauvre en acides nucléiques, représente une proportion importante du matériel nucléique du grain, du fait de sa prédominance pondérale.

On ne saurait donc prétendre que les acides nucléiques trouvés dans la farine, pourraient provenir de contamination par le germe lors de la mouture.

Tableau 11: Composition nucléique de différents produits de la mouture du grain selon différentes techniques de détermination:
(en mg d'acides nucléiques pour 100 g s.s.)

| | | Extraction par NaCl 1 M (méthode originale) | Précipitation des bases puriques par $AgNO_3$ (NETUPSKAYA et al., 1959) | Extraction perchlorique à 90° C (SCHNEIDER et al., 1950) | Extraction perchlorique différentielle (OGUR et ROSEN, 1950) | Valeurs moyennes |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Blé entier | ARN | 128 | - | - | 125 | 126 |
| | ADN | 82 | - | 86 | 84 | 84 |
| | AN ttx | 210 | 225 | - | 209 | 210 |
| Albumen (farine) | ARN | 59 | - | - | 55 | 57 |
| | ADN | 48 | - | 50 | 48 | 49 |
| | AN ttx | 107 | 112 | - | 103 | 106 |
| Fractions intermédiaires (remoulages) A | ARN | 523 | - | - | 525 | 524 |
| | ADN | 220 | - | 253 | 250 | 241 |
| | AN ttx | 743 | 795 | - | 775 | 765 |
| Fractions intermédiaires (remoulages) B | ARN | 835 | - | - | 817 | 826 |
| | ADN | 325 | - | 365 | 357 | 349 |
| | AN ttx | 1.160 | 1.220 | - | 1.174 | 1.175 |
| Enveloppes externes (sons) | ARN | 323 | - | - | 345 | 324 |
| | ADN | 142 | - | 167 | 152 | 154 |
| | AN ttx | 465 | 520 | - | 497 | 488 |
| Germes (*) | ARN | 2.425 | - | - | 2.255 | 2.340 |
| | ADN | 965 | - | 1.028 | 1.020 | 1.005 |
| | AN ttx | 3.390 | 3.555 | - | 3.275 | 3.345 |

(*) Les germes dont il est fait état ici ne proviennent pas du même diagramme de mouture que les autres produits (farine, remoulages, sons). Dans ce dernier diagramme, les germes, non séparés, se retrouvent dans les remoulages.

Tableau 12: Composition nucléique de différents produits de la mouture du grain de blé: (résultats rapportés au grain entier).

| | ARN | | ADN | | AN totaux | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | mg/100 g de blé | % de l'ARN total du blé | mg/100 g de blé | % de l'ADN total du blé | mg/100 g de blé | % des AN totaux du blé |
| Albumen (78,3 % du grain) | 44,6 | 29,0 | 38,4 | 43,9 | 83,0 | 34,2 |
| Fractions intermédiaires A(1,6%) | 8,4 | 5,4 | 4,1 | 4,7 | 12,5 | 5,1 |
| Fractions intermédiaires B(5,8%) | 47,9 | 31,2 | 20,6 | 23,6 | 70,5 | 29,0 |
| Enveloppes externes (15,3 %) | 52,8 | 34,4 | 24,3 | 27,8 | 77,1 | 31,7 |
| Blé entier total | 153,7 | 100,0 | 87,4 | 100,0 | 243,1 | 100,0 |
| Blé entier: valeurs dosées | 126 | - | 84 | - | 210 | - |
| Germes industriels (sur la base de 2 % du grain de blé) | 46,8 | 37,1 | 20,1 | 23,9 | 66.9 | 31,9 |

Compte tenu de la teneur du germe en ARN et ADN et de son importance dans le grain: 2 % en moyenne (GREWE et LECLERC, 1943), cet organe ne peut, en effet, rassembler plus du tiers des acides nucléiques totaux du grain, ce que l'on retrouve effectivement dans les fractions intermédiaires.

On peut donc considérer que la majeure partie des constituants nucléiques, présents dans la farine, préexisteraient dans l'albumen du grain, tandis que ceux, présents dans les enveloppes, auraient pour origine l'assise protéique.

3.3.2 - DNP isolées de différents tissus du grain de blé:

Le protocole élaboré pour le germe de blé a été appliqué à différents tissus du grain pour en isoler les DNP.

L'opération apparaît plus délicate qu'à partir du germe, du fait de la moins grande richesse en composés nucléiques (cf. tableau 11) de ces tissus, notamment ceux de l'albumen du grain dans lequel les cellules sont fortement dégénérées.

Il a cependant été possible d'obtenir, après extractions en milieu salin concentré et purifications, des préparations désoxyribonucléoprotéiques dont quelques caractéristiques sont fournies dans le tableau 13.

Tableau 13: Composition des préparations désoxyribonucléiques de différents tissus du grain de blé (variété Cappelle) - Rendement des isolements:

| Matériel d'étude | Composition des DNP (en mg pour 100 mg de DNP) | | | Rendements en DNP (*) |
|---|---|---|---|---|
| | ADN | ARN | Protéines (par différence) | |
| Grain total | 27,5 | 2,0 | 70,5 | 55 - 60 |
| Albumen (farine) | 20,1 | 2,0 | 77,9 | 25 - 30 |
| Fractions intermédiaires (**) (a | 29,5 | 1,8 | 68,7 | 65 |
| Fractions intermédiaires (**) (b | 36,2 | 1,6 | 62,2 | 75 |
| Enveloppes (sons) | 22,3 | 2,5 | 75,2 | 50 - 55 |
| Germes | 40,0 | 1,5 | 58,0 | 80 - 88 |

(*) Exprimé en % d'ADN de DNP isolée / ADN total du tissu.

(**)Ces fractions correspondent à des régions externes de l'albumen dans lesquelles on retrouve notamment des parois cellulosiques, une partie de l'assise protéique, ainsi que des fractions de germes. Ces derniers apparaissent davantage dans la fraction b (remoulages bis) que dans la fraction a (remoulages blancs).

Il apparaît que le rendement en ADN isolé sous forme de DNP purifiée est généralement plus faible que chez le germe et que la teneur en ADN des préparations est inférieure à celle des DNP de germe. En effet, des proportions importantes d'ADN sont perdues au cours des lavages NaCl 0,14 M ainsi que des purifications de la DNP, notamment pour les tissus les plus dégénérés du grain. Chez ces derniers, seule une faible partie de l'ADN semble donc se trouver sous forme de DNP présentant les propriét classiques de solubilité, contrairement à ce qui a lieu chez le germe. Ces différences semblent d'ailleurs s'accorder à celles observées par KONAREV et al. (1965) entre tissus différenciés et embryonnaires.

En outre, les DNP de ces différents tissus,à l'exception du germe, n'ont jamais fourni de précipité de type fibreux. Même à partir des fractions intermédiaires (b), dont la richesse en germe est élevée, et dont les DNP présentent des caractéristiques voisines de celles du germe, les précipités sont de nature granuleuse.

Ces différences avec les résultats relatifs au germe doivent être interprétées avec prudence car les tissus analysés ont été obtenus à partir d'un diagramme de mouture du grain, ce qui n'exclut pas certaines modifications (échauffements au moment du broyage) pouvant accentuer les altérations causées par la dégénérescence des cellules de l'albumen au cours de la maturation.

Il n'est donc pas permis à ce stade, d'expliquer si les différences sensibles observées au niveau des caractéristiques chimiques et physiques des DNP des régions analysées sont réelles ou s'il s'agit de dénaturations, ou de contaminations liées à la grande complexité de ces tissus de réserve du grain.

### 3.3.3 - Les histones de différents tissus du grain de blé :

A partir des préparations désoxyribonucléoprotéiques isolées de différents tissus du grain, on a extrait les fractions protéiques acido-solubles à l'aide d'HCl 0,25 N, selon le protocole élaboré pour l'histone de germe.

On observe ainsi que le taux de protéines acido-solubles dans les DNP est plus élevé pour les différents tissus (exemple: 54,7 % pour l'albumen) que pour le germe (46 %). Par ailleurs, les protéines acido-solubles originaires des tissus, sont solubilisées en quasi-totalité dès pH 1,2 et apparaissent donc plus aisément extractibles que les histones du germe.

Afin de déterminer si les protéines ainsi extraites en milieu acide sont réellement des histones et si leur constitution permet de déceler des différences entre les divers tissus du grain, on a procédé à leur fractionnement électrophorétique (fig. 32).

Dans l'ensemble, on observe que la constitution des protéines en provenance des différentes régions du grain, est analogue à celle de l'histone de germe. Toutefois, on note pour tous les tissus, et particulièrement pour l'albumen, la présence de 2 bandes de faible mobilité qu'on ne trouve pas (ou seulement à l'état de

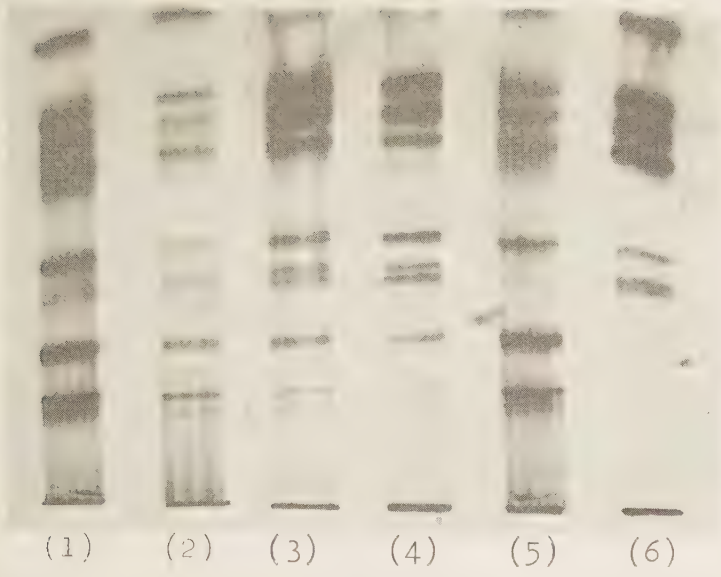



Figure 32: Diagrammes électrophorétiques des protéines acido-solubles de DNP des différentes régions du grain: (1) grain total; (2) albumen; (3) et (4) fractions intermédiaires (remoulages blancs et bis); (5) enveloppes; (6) germe.

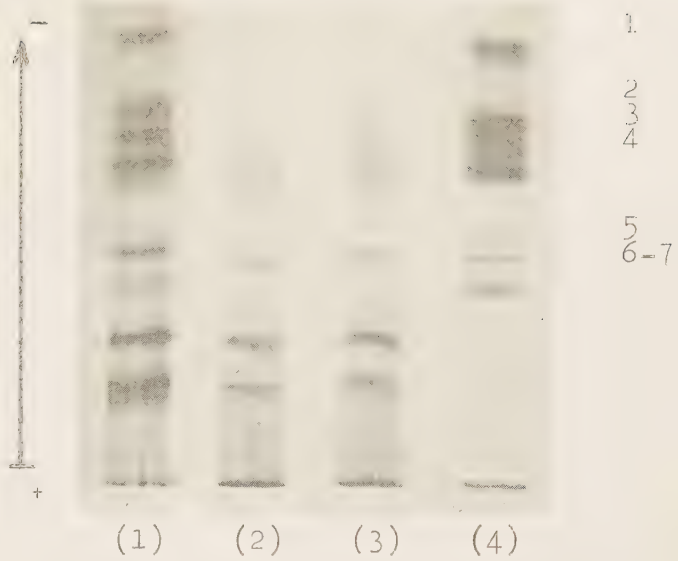



Figure 33: Diagrammes électrophorétiques: (1) protéine acido-soluble de DNP d'albumen; (2) composants 8-9 isolés; (3) globulines nucléaires de germes industriels; (4) histone de germes.

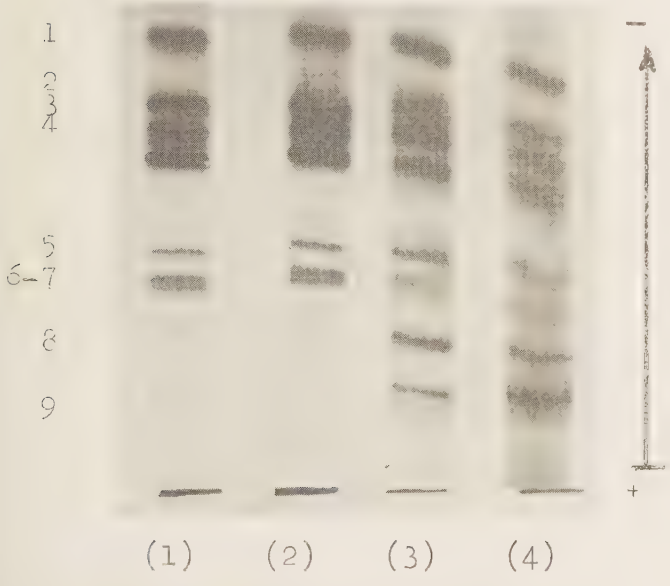



Figure 34: Diagrammes électrophorétiques des protéines acido-solubles isolées de (1) DNP de germe; (2) gluténine purifiée de germe; (3) DNP de farine; (4) globuline non purifiée de farine.

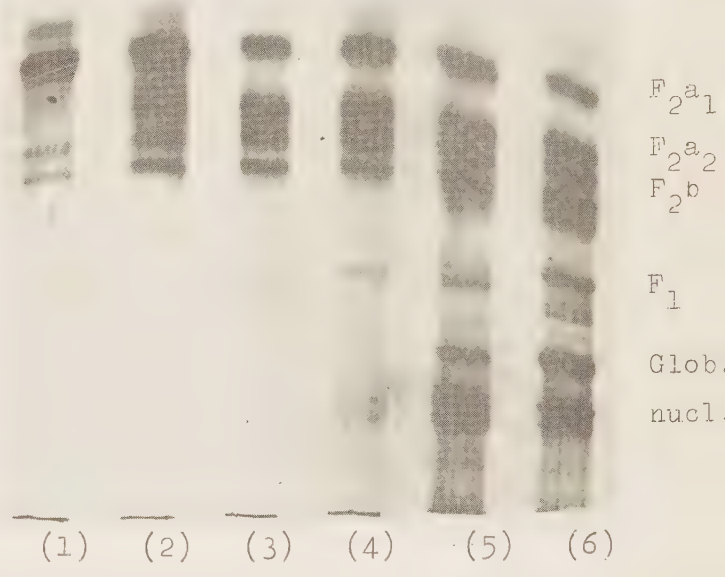



Figure 35: Diagrammes électrophorétiques des histones de grains de blés en cours de maturation. Nombre de jours après la fécondation: (1) 12 j. (2) 16 j. (3) 23 j. (4) 30 j. (5) 41 j. (6) 52 j.

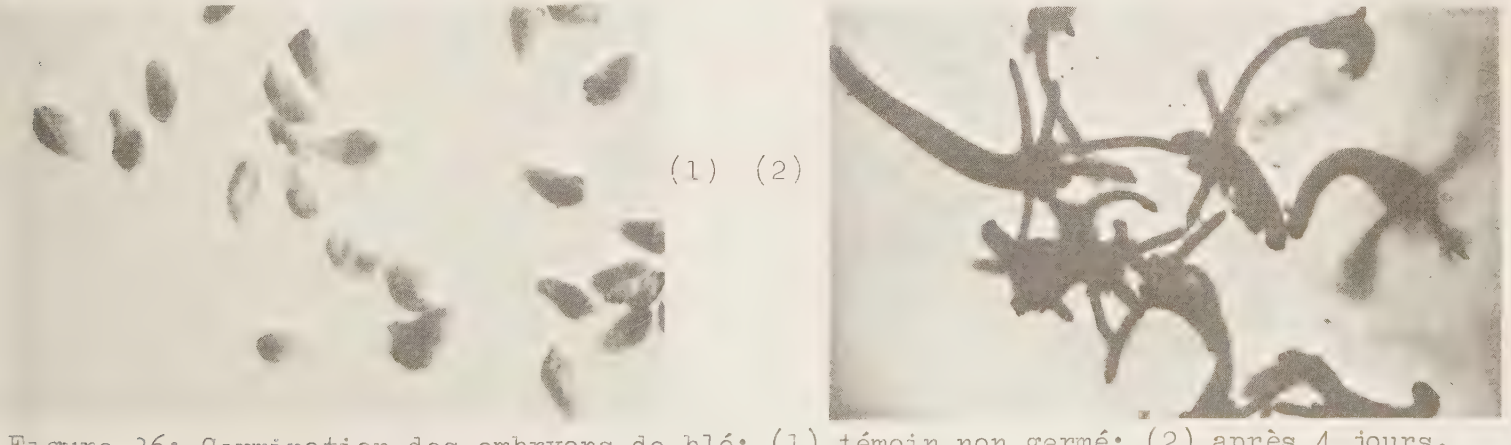



Figure 36: Germination des embryons de blé: (1) témoin non germé; (2) après 4 jours.

trace) chez le germe.

Il est vraisemblable que ces composants, désignés par 8-9 sur les diagrammes histones, sont des protéines contaminantes (de nature non-histone) qui s'apparentent, comme le montre la figure 33, aux globulines nucléaires isolées de préparations de noyaux cellulaires de germe (cf. fig 12).

Par ailleurs, l'isolement de ces composants 8-9 à partir d'une DNP d'albumen (par extraction sélective à pH 0,6, après élimination des autres fractions à pH 1,2) a permis de renforcer cette argumentation. L'analyse des acides aminés (tableau 14) fait apparaître, en effet, une très grande analogie de composition entre ces composants et les globulines nucléaires de germe, notamment pour les rapports lysine/arginine anormalement bas (0,51 et 0,42), valeurs que l'on retrouve dans la protéine acido-soluble totale de l'albumen (0,80).

Or, chez l'histone isolée de germe, ce rapport est de 1,86 et, à notre connaissance, aucune fraction histone de rapport lysine/arginine inférieur à 0,6 n'a jusqu'à présent été signalée.

Ces différentes observations semblent donc apporter la preuve que les composants 8-9 ne sont pas de nature histone mais bien des protéines du type globuline nucléaire.

La contamination des histones de différentes régions du grain par des protéines de ce type pourrait avoir deux origines: d'une part, la dégénérescence de la plupart des cellules, notamment dans l'albumen, au cours de la maturation; d'autre part, certaines dégradations d'origine mécanique lors des opérations de mouture. De telles modifications de la structure du matériel d'étude seraient susceptibles de favoriser l'élimination de ces protéines normalement insolubles en milieu 0,14 M et en particulier les globulines nucléaires, ce qui expliquerait leur présence au niveau des DNP.

Ces observations confirment l'hypothèse émise antérieurement (§ 3.1.2) selon laquelle l'isolement des DNP en milieu 1 M pourrait, dans certains cas conduire à des réassociations non natives entre ADN et protéines de basicité voisine de l'histone. C'est ce qui semble se produire pour différents tissus du grain chez lesquels les histones apparaissent contaminées par d'autres protéines basiques. Il semble en être de même dans le cas du germe (cf. § 3.6) lorsqu'il ne présente pas un degré de pureté suffisant.

Nous remarquons d'ailleurs, que GOFSHTEIN (1967) fait également état de fractions contaminantes dans les histones d'embryon de blé obtenues après isolement des DNP en milieu salin concentré. De même, FAMBROUGH et al. (1968) rapportent que les histones isolées (même par l'intermédiaire de la chromatine purifiée) de tissus âgés (cotylédons de pois) sont toujours contaminées par des fractions de faible mobilité pouvant être des protéines ribosomales.

La figure 32 fait apparaître également la disparition partielle des bandes 6 et 7 chez le grain total et les enveloppes externes. Ce phénomène pourrait

Tableau 14: Composition en acides aminés des histones de germe et d'albumen de blé, comparativement aux composants 8-9 isolés d'albumen et aux globulines nucléaires de germe:

| | Histone de germe | Protéine acido-soluble de DNP d'albumen | Composants 8-9 d'albumen | Globulines nucléaires de germe |
|---|---|---|---|---|
| Acide aspartique | 4,5 | 6,6 | 8,7 | 9,1 |
| Thréonine | 5,6 | 4,3 | 3,5 | 3,2 |
| Sérine | 4,4 | 5,6 | 6,6 | 7,3 |
| Acide glutamique | 7,6 | 11,0 | 14,7 | 15,0 |
| Proline | 7,5 | 5,4 | 5,4 | 4,8 |
| Glycocolle | 8,0 | 9,3 | 11,0 | 11,5 |
| Alanine | 13.0 | 10,8 | 8,8 | 9,1 |
| Valine | 5,9 | 6,7 | 7,3 | 7,7 |
| Cystéine | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Méthionine | tr. | 0,7 | tr. | tr. |
| Isoleucine | 5,1 | 5,4 | 4,0 | 3,4 |
| Leucine | 8,1 | 7,3 | 6,6 | 7,0 |
| Tyrosine | 2,1 | 1,8 | 1,6 | 1,3 |
| Phénylalanine | 2,4 | 3,2 | 3,8 | 3,3 |
| Lysine | 15,3 | 8,0 | 4,7 | 3,9 |
| Histidine | 1,8 | 2,6 | 3,7 | 4,0 |
| Arginine | 8,2 | 10,0 | 9,8 | 9,4 |
| Lys / Arg | 1,86 | 0,80 | 0.51 | 0,42 |

correspondre à une perte de ces fractions (très aisément dissociables de l'ADN), au cours des purifications de la DNP, par insolubilisation sous l'influence des composés de type polyphénol dont les enveloppes du grain sont particulièrement riches.

Si alors on considère seulement les fractions de nature histone (N°S 1 à 7) présentes dans les divers tissus, on note des différences dans les proportions relatives des composants par rapport à l'histone de germe. Chez cette dernière, les fractions rapides (1 à 4) prédominent largement. Chez les autres régions du grain, il apparaît au contraire un certain équilibre entre composants rapides et lents, notamment dans l'albumen.

Ces faits semblent par ailleurs venir à l'appui d'observations rapportées antérieurement (§ 3.1.3.3 et 3.1.3.4) au sujet d'histones de germes présentant une constitution analogue à celle des histones d'albumen décrites ci-dessous. Or, toutes ces protéines proviennent de DNP présentant un état granuleux lors de leur isolement. On pourrait donc admettre que l'état physique (nature fibreuse ou non fibreuse de la DNP) est à relier à la répartition quantitative des constituants histones et à l'absence ou à la présence de contaminants.

En définitive, même si l'isolement d'histone à partir de tissus de réserve de structure très complexe implique des risques de contamination, il permet néanmoins de mettre en évidence des différences quantitatives (et non qualitatives) de constitution entre les histones en provenance des diverses régions du grain de blé. Des observations similaires ont déjà été rapportées au niveau de différents tissus de la plante de blé (tiges, racines, feuilles,..) (TERAOKA, 1968). De plus, cela s'accorde entièrement avec les observations de FAMBROUGH et al. (1968), BONNER et al. (1968), qui signalent des différences du même type entre divers organes de la plante de pois, notamment pour le composant $F_1$ plus important chez les organes différenciés (graine mûre) que chez les organes embryonnaires.

### 3.3.4 - Relations entre les histones et les protéines classiques du blé définies selon les critères de solubilité:

La présence d'acides nucléiques et de protéines basiques du type histone a été rapportée dans diverses fractions protéiques de graines de céréales (KONDO et MORITA, 1954; AYRAPÄÄ, 1957).

En ce qui concerne le grain de blé, nous avons pu vérifier les observations de BOURDET et FEILLET (1967) selon lesquelles les acides nucléiques se répartissent essentiellement entre les fractions globulines et gluténines. De plus, nous avons observé que cette répartition de l'ARN et de l'ADN varie considérablement entre les différentes régions du grain. C'est ce que montre le tableau 15, limité aux deux tissus les plus caractéristiques: l'albumen et le germe.

Tableau 15: Composition nucléique des quatre types de protéines au blé: (exemple de l'albumen et du germe).

| | | Composition en ɣ/100 mg de protéine | | Résultats rapportés au tissu total (en mg/100 g s.s.) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ADN | ARN | ADN | | ARN | |
| Albumen | Albumines | 220 | 555 | 5 | | 14 | |
| | Globulines | 6.360 | 3.580 | 35 | | 19 | |
| | Gliadines | 140 | 373 | 4 | 52 | 10 | 62 |
| | Gluténines | 291 | 690 | 8 | | 19 | |
| Germes | Albumines | 112 | 5.270 | 11 | | 417 | |
| | Globulines | 1.230 | 16.900 | 142 | | 1.920 | |
| | Gliadines | 427 | 1.370 | 3 | 1.038 | 12 | 2.519 |
| | Gluténines | 15.680 | 3.020 | 882 | | 170 | |

Chez le germe, ce tableau met en évidence la nette prédominance de l'ARN dans les globulines et de l'ADN dans les gluténines. Cette différence s'explique par le mode d'isolement de ces deux classes de protéines. La technique d'extraction sélective des RNP (§ 3.1.1.2) s'apparente en effet à celle utilisée pour l'isolement des albumines-globulines (mise en suspension dans NaCl 0,5 M), ce qui explique les taux élevés en ARN et faibles en ADN des globulines. En revanche, les DNP, peu entraînées en milieu NaCl 0,5 M (cf. § 3.1.1.1) et normalement insolubles dans l'éthanol destiné à isoler les gliadines, se retrouvent inévitablement au niveau de la fraction gluténine.

Chez l'albumen, on observe au contraire, une forte concentration de l'ADN dans les globulines, tandis que l'ARN se répartit assez uniformément entre les 4 fractions protéiques.

Ces différences fondamentales de composition nucléique entre l'albumen et le germe apparaissent également, à des degrés intermédiaires, au niveau des autres tissus du grain. L'origine de ces phénomènes pourrait être recherchée dans la structure histologique des différentes régions. Ainsi le germe, partie vivante du grain, renfermerait des DNP aux propriétés de solubilité classiques. En revanche, les modifications profondes à la fois physiologiques et mécaniques, subies par les tissus de l'albumen, rendraient ceux-ci beaucoup plus accessibles aux solvants, expliquant ainsi la solubilisation des constituants nucléaires dès la force ionique 0,5 M.

La forte teneur en ARN (17 %) des globulines de germe peut être reliée à l'état de dénaturation très marqué de ces protéines, lorsqu'on les isole par dialyse et lyophilisation de l'extrait salin. Cela rejoint donc l'hypothèse émise § 3.1.1.2 au sujet des difficultés de remise en solution des préparations de RNP.

Cet aspect quantitatif sur la composition nucléique des différentes protéines du grain a été complété par une étude qualitative. En soumettant les gluténines de germe à une série de purifications en milieux salins 1 M et 0,14 M, on a isolé une préparation de DNP dont la fraction acido-soluble apparait identique à l'histone obtenue par le procédé classique (fig. 34).

De même, le diagramme d'un extrait acide direct de globuline de farine non purifiée apparait très voisin de celui de l'histone de farine précédemment rapporté. Il semble donc, malgré le taux relativement faible d'ADN dans la globuline de farine qu'il y ait analogie entre la fraction acido-soluble et l'histone elle-même. Les constituants autres que la DNP pourraient donc être des protéines non basiques ne migrant pas dans les conditions de fractionnement des histones.

En revanche, aucune protéine basique pouvant s'apparenter à une histone n'a pu être isolée des autres fractions protéiques citées et notamment des gluténines de farine et des globulines de germe.

La répartition de l'ADN et la constitution électrophorétique permettent donc de montrer qu'après fractionnement des protéines selon le principe d'OSBORNE (1907), les DNP se retrouvent principalement, soit dans les gluténines (cas du germe), soit dans les globulines (cas de l'albumen). L'histone , facilement mise en évidence à partir de ces groupes protéiques, n'en constitue cependant qu'une fraction mineure (environ 7 % des globulines d'albumen et 17,5 % des gluténines de germe

## 3.4 - EVOLUTION DES HISTONES AU COURS DE LA MATURATION DU GRAIN

### 3.4.1 - Résultats expérimentaux :

Cette étude a été effectuée sur la lignée INRA 62-15. Le matériel de base pour l'isolement d'histones consistait en 11 échantillons de grains prélevés régulièrement entre la fécondation et la maturité. Ces grains, lyophilisés après leur récolte et conservés à -20°, ont fait l'objet d'une première étude (FEILLET, 1965) concernant l'évolution quantitative des protéines (albumines, globulines, gliadines, gluténines) ainsi que le fractionnement analytique des gliadines.

Notre travail a consisté pour chaque stade de maturation, à isoler les histones au moyen de la technique élaborée pour le germe et appliquée précédemment au grain de blé mûr. Les quantités limitées de matériel dont nous disposions, n'ont permis d'isoler que de faibles poids de protéines. Ainsi, si pour les derniers prélèvements on a pu obtenir jusqu'à 50 mg d'histone, en début de maturation les quantités n'ont été que de 15 à 25 mg (pour 100 g de grain sec). Dans ces conditions, seule une étude qualitative (fractionnement électrophorétique) était possible. Nous nous sommes donc limités à suivre l'évolution de la constitution de l'histone.

La figure 35 fournit ainsi les diagrammes des histones de quelques échantillons en cours de maturation correspondant respectivement au 12è, 16è, 23è, 30è, 41è et 52è jour après la fécondation.

L'interprétation des résultats doit tenir compte du fait qu'on a opéré sur des grains entiers, avec les inconvénients que cela comporte (§ 3.3.3) notamment la contamination par des composants de type globuline nucléaire et l'affaiblissement des fractions de type $F_1$.

Néanmoins, une nette évolution de la constitution protéique apparaît:

- les premiers prélèvements, 12è et 16è jour, contiennent des histones formées uniquement de fractions rapides (type $F_2a$ et $F_2b$). Un faible composant migrant au-delà de $F_2a_1$ est visible, mais nous ignorons s'il est natif ou s'il provient d'une hydrolyse causée par une altération du matériel.

- à partir du 23è jour, les fractions rapides sont définitivement constituées, tandis que des composants de mobilité moyenne commencent à apparaître. Ce caractère s'accentue dans les derniers prélèvements pour aboutir, vers le 52è jour (grain mûr), au diagramme classique précédemment observé.

- la contamination de l'histone par les composants lents (globulines nucléaires) n'apparait que vers le 30è jour.

3.4.2 - Discussions :

L'interprétation d'une telle évolution de la constitution de l'histone dans un matériel aussi complexe que le grain de blé, ne peut être abordée qu'avec beaucoup de précautions. Les changements observés peuvent, en effet, résulter de phénomènes simultanés mais différents, voire antagonistes, au niveau des diverses régions du grain.

Une étude plus approfondie de la question, exigerait certainement de travailler séparément sur plusieurs tissus du grain, notamment l'embryon et l'albumen. Cependant, compte tenu de la proportion relativement faible de l'embryon lui-même et des histones qui en sont issues (cf. § 3.3.1), on a considéré ici que l'évolution observée pouvait, en première approximation représenter celle de l'albumen.

Dans le caryopse de blé, le phénomène essentiel qui accompagne la formation de l'embryon durant la maturation est,en effet, le développement considérable d'un albumen, tissu triploïde, indifférencié et se chargeant progressivement de réserves amylacées. Aussitôt après la fécondation, les cellules du grain sont donc le siège d'un métabolisme intense puis peu à peu l'activité des cellules décroît. Les cellules se gorgent de granules d'amidon et de protéines de réserve peu solubles, elles se déshydratent, dégénèrent et le taux des synthèses tend aussi à s'annuler lorsque le grain arrive à maturité.

Que se passe-t-il au niveau des noyaux cellulaires?

On admet que la fonction de l'ADN se situe au niveau de la conservation et de la transmission de l'information génétique codée dans sa séquence de nucléotides. Mais on sait également que la totalité de l'ADN présent dans toute cellule ne peut être transcrite en ARN messagers. Cela implique l'existence d'une répression à la fois permanente (chez les organismes différenciés) et temporaire (fonctionnelle) de certaines portions de l'ADN. Les histones, qui, par association avec l'ADN rendent ce dernier génétiquement inactif, pourraient assumer ce rôle d'inhibiteur des gènes.

La question de savoir si les complexes formés par les histones et l'ADN sont biologiquement significatifs, a été longuement étudiée. Ainsi HUANG et BONNER (1962) ont montré que l'aptitude de l'ADN à servir de modèle pour la biosynthèse d'ARN in vitro, était considérablement affaiblie lorsque l'ADN était complexé par des histones, la chromatine naturelle n'assumant elle-même cette biosynthèse qu'à un taux limité. Il est apparu, que l'abaissement de l'activité "template" du complexe ADN-histones, était proportionnel à la quantité d'histones ajoutées et, qu'inversement, la déprotéinisation de la chromatine entraînait un accroissement spectaculaire des synthèses d'ARN in vitro.

On peut donc imaginer que lors du ralentissement du métabolisme du grain au cours de sa maturation, il se produise un tel accroissement de la quantité d'histones au niveau de la chromatine, ces protéines étant appelées à bloquer les nombreux gènes dont l'activité est devenue inutile ou même nuisible pour la cellule.

Dans la mesure où les histones isolées représentent bien les entités biochimiques mobilisées pour assurer l'inhibition des gènes, et avec toute la prudence que requiert une telle interprétation, on remarque que nos observations traduisent bien ce phénomène: le jeune grain est relativement pauvre en histones, tandis qu'au cours du vieillissement, davantage d'histones peuvent être isolées dans les mêmes conditions. De plus, ces protéines présentent une complexité croissante, ce qui amène à poser le problème du rôle particulier des différents composants.

A ce niveau, de nombreux auteurs tels que HUANG et al. (1964) ou JOHNS et HOARE (1970) ont montré que selon les fractions histones considérées, il fallait des quantités plus ou moins élevées pour obtenir une même inhibition de l'ADN. Mais, à l'aide de mesures d'activité "template" ou tout simplement de taux de précipitation de l'ADN, les uns ont démontré l'efficacité particulière des histones riches en lysine et en alanine ($F_1$), tandis que d'autres ont rapporté la même observation pour celles riches en arginine ($F_3$ ou $F_2a_1$).

Selon JOHNS et HOARE (1970), cette contradiction n'est due qu'à une différence dans le mode d'expression des résultats, mais WILHELM et al. (1971) et BEX (1972) soulignent l'importance probable, outre la répression proprement dite, d'une inhibition préférentielle de l'ARN-polymérase par les histones riches en arginine.

Il ressort néanmoins de cet ensemble complexe de travaux in vitro, que les histones riches en lysine et celles riches en arginine, présentent un comportement différent. Il est alors intéressant de noter qu'au niveau de la maturation du grain de blé, des observations similaires peuvent être effectuées. Ainsi le groupe de constituants rapides (types $F_2a_1$, $F_2a_2$, $F_2b$) n'apparaît pas influencé par l'évolution du grain puisqu'il reste constamment présent. En revanche, les constituants lents (type $F_1$) ne sont pas visibles (du moins sous forme associée à l'ADN dans la DNP isolée) dans le jeune grain et ne semblent mobilisés que lors des derniers stades de la maturation.

Dans le cas précis de notre expérience, on pourrait donc émettre les hypothèses suivantes:

- les fractions relativement riches en arginine, seraient des constituants stables de la DNP et comme l'ont envisagé d'autres auteurs (FAMBROUGH et BONNER, 1968; DE LANGE et al., 1969 b), leur rôle pourrait se situer essentiellement au niveau de la structure de la nucléohistone et du blocage définitif de certaines séquences de l'ADN au moment de la différenciation cellulaire.

- les fractions relativement riches en lysine, qui sont les moins solidement fixées sur l'ADN, n'apparaîtraient qu'au moment où le ralentissement des synthèses nécessite la répression de certains gènes. Leur rôle serait donc essentiellement fonctionnel: elles constituraient des outils efficaces de la régulation de l'activité des gènes.

Cela rejoint d'ailleurs, les conclusions d'autres travaux: FAMBROUGH

et al. (1968) par exemple, qui étudient les histones de différents tissus du pois, notent qu'un taux d'histone élevé est toujours lié à une forte teneur en fraction $F_1$ et à une faible activité "template" de la chromatine, c'est-à-dire à un métabolisme ralenti. Ainsi, chez le cotylédon de pois, le taux de $F_1$ s'accroît fortement au cours de la maturation, celui des autres fractions demeurant stable.

On retient alors, en conclusion, que malgré une différenciation physico-chimique relativement faible de l'histone de blé, le comportement (et vraisemblablement la fonction) des deux principaux groupes de constituants reste comparable à celui mis en évidence chez les histones animales.

## 3.5 - EVOLUTION DES HISTONES AU COURS DE LA GERMINATION

Le fait de travailler sur grain de blé total, devrait permettre de suivre l'évolution des histones au cours d'une germination dans des conditions naturelles. Cependant, comme nous l'avons signalé (§ 3.3.3), l'isolement de l'histone à partir du grain entier entraîne des contaminations (globulines nucléaires) et des pertes au niveau des fractions dénommées $F_1$.

C'est pourquoi nous avons également étudié une germination à partir d'embryons préalablement isolés, donc débarrassés des tissus de réserve du grain, afin de suivre l'évolution des histones au moyen de diagrammes plus représentatifs.

### 3.5.1 - Conditions de germination:

#### 3.5.1.1 - Cas du grain de blé:

Plusieurs lots de 100 g de grains, de variété Cappelle, sont mis à germer sur des couches de sable humide, à 20° C et à l'obscurité. Les prélèvements sont effectués après des temps variables de germination: 1, 2, 3, 4 ou 5 jours.

Les grains, ainsi que les plantules développées sont alors aussitôt congelés, lyophilisés puis broyés. Dans le cas de l'expérience de 5 jours, on a également divisé les plantules en trois fractions correspondant aux gemmules, aux radicules et aux grains résiduels.

#### 3.5.1.2 - Cas des embryons isolés:

La technique d'isolement retenue (§ 2.1.3) présente, par rapport à d'autres méthodes décrites (VASIL'EVA et GOFSHTEIN, 1964; BOULTER et al., 1965; VASIL'EVA et al., 1969; WEEKS et MARCUS, 1969), l'avantage de la simplicité et de la pureté du matériel isolé (généralement supérieure à 95 %).

Le procédé est apparu particulièrement satisfaisant pour les blés à grains vitreux. C'est pourquoi nous avons retenu la variété Atys. Pour celle-ci, l'embryon (qui pèse en moyenne 0,75 mg pour un grain de 47 mg) représente donc 1,6 % du grain. La technique d'isolement ne permet cependant d'obtenir que 0,85 g d'embryons pour 100 g de grain, ce qui correspond à un rendement de 50 - 55 % des embryons totaux.

Des lots de 5 grammes d'embryons sont mis à germer sur un milieu nutritif (agar 1 % - glucose 1 %) dans des boites de Pétri, à 20°C et à l'obscurité, pour des durées de 1 à 4 jours. La figure 36 illustre le développement de ces embryons isolés. On a constaté que le pouvoir germinatif était très élevé, malgré le

séjour des embryons en milieu cyclohexane-$CCl_4$, qui élimine une partie de leurs lipides, lors de l'isolement.

Le développement des plantules reste cependant limité du fait que le milieu nutritif utilisé n'est certainement pas optimal (on dépasse rarement le stade où la gemmule atteint 1 cm). Les plantules, à divers stades de germination, sont alors recueillies, congelées, lyophilisées.

3.5.2 - Résultats:

3.5.2.1 - Histones du grain de blé germé:

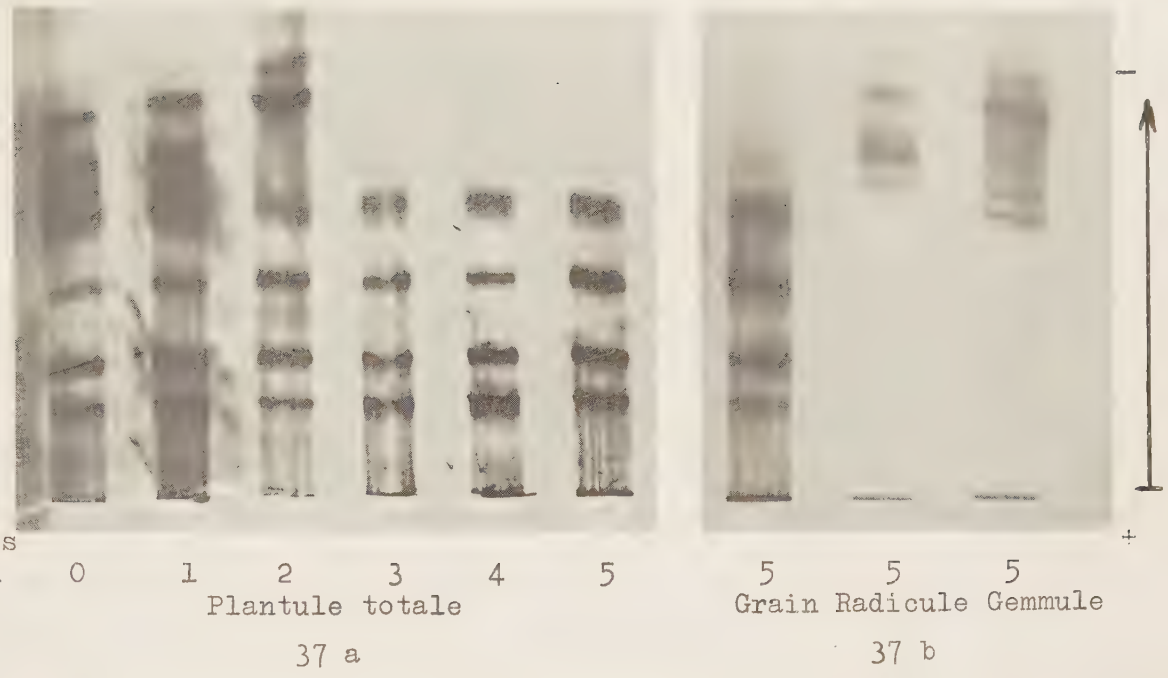
Après isolement des histones à partir des différents lots de grains germés, on constate que les quantités extraites décroissent progressivement avec le développement de la germination, comme le montrent les valeurs suivantes:

| Matériel étudié | Quantité d'histone recueillie (mg/100g de grains de blé) |
|---|---|
| Témoin non germé | 66 |
| Grain germé 1er jour | 62 |
| " 2° " | 55 |
| " 3° " | 30 |
| " 4° " | 16 |
| " 5° " | 10 |

Si l'on admet que ces valeurs représentent réellement les quantités d'histones présentes au niveau des DNP, cela traduit un abaissement progressif du taux d'histone dans la plantule totale. Par ailleurs, les diagrammes électrophorétiques des histones isolées, dans les conditions précédemment décrites pour le grain mûr, aux différents stades de la germination, sont fournis par les figures 37 a et 37 b.

Le fait de travailler sur grain total explique la présence de bandes contaminantes lentes (8-9) et la disparition quasi totale des fractions $F_1a$ et $F_1b$ (cf. § 3.2.6). A l'inverse de l'évolution observée au cours de la maturation, on constate que l'abaissement progressif du taux d'histone est lié à de profondes transformations qualitatives du diagramme (diminution du nombre des composants).

Il n'y a pas de modification de l'histone au cours du premier jour. Pendant le 2è jour, les fractions $F_2a_2$ et $F_2b$ disparaissent, puis le 3è jour, la fraction $F_2a_1$. Pendant toute la durée de germination, les bandes 8-9,




37 a

37 b

Figure 37 a: Constitution électrophorétique des histones isolées de grains de blé en cours de germination.

Figure 37 b: Constitution électrophorétique des histones isolées de gemmule, radicule et grain résiduel, après germination de 5 jours.

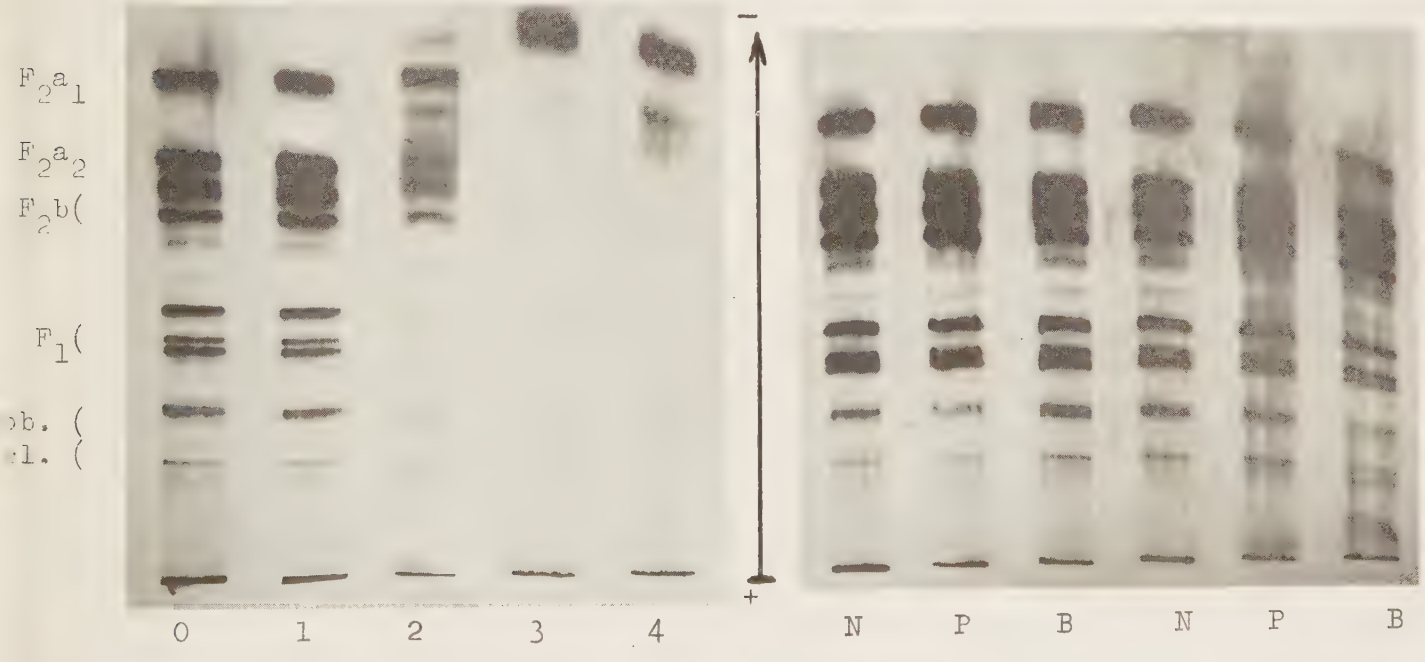



Figure 38: Constitution électrophorétique des histones isolées d'embryons de blés en cours de germination (0, 1, 2, 3, 4 : nombre de jours de germination).

Figure 39: Histones isolées de germes de blés en provenance de différents lieux de culture (N = Nièvre; P = Picardie; B = Beauce). Variétés MAJOR et MAGDALENA.

non-histones, restent stables, de même qu'un composant situé au niveau de $F_1c$ et dont la nature est à préciser. Lorsqu'on examine seulement les gemmules et radicules, seules les bandes rapides de type $F_2a$ et $F_2b$ sont visibles, avec en outre, pour les gemmules, un composant de plus grande mobilité que $F_2a_1$.

3.5.2.2 - Histones du seul embryon germé:

Selon le procédé décrit précédemment pour le germe industriel, on a isolé les histones des embryons en cours de germination. La figure 38 présente leurs diagrammes électrophorétiques. La meilleure représentativité des diagrammes histones dans le cas de l'embryon, vérifie en les précisant, les observations précédentes sur grain total.

Il y a encore contamination par les globulines nucléaires (8-9). Toutefois, les bandes $F_1$ sont nettement visibles jusqu'à 24 heures de germination, puis disparaissent. Les composants $F_2a$ et $F_2b$ disparaissent eux-mêmes au cours du 3° jour alors qu'apparaît un nouveau composant plus mobile que $F_2a_1$. Après 4 jours on note la réapparition de quelques fractions situées au niveau de $F_2a$.

3.5.3 - Discussions:

Alors que l'augmentation progressive du nombre des composants histones au cours de la maturation du grain accompagne un ralentissement du métabolisme, le phénomène de germination entraîne une diminution rapide du nombre de ces composants. Cependant, il ne semble pas que les mécanismes biochimiques mis en jeu dans les deux cas soient inverses l'un de l'autre. Les deux phénomènes sont en effet très différents et n'intéressent pas les mêmes régions du grain, puisque, lors de la maturation, les synthèses concernent l'ensemble des tissus du grain, alors que la germination trouve son point de départ essentiellement dans le germe.

Lorsque la germination débute, le métabolisme de l'embryon s'accroît considérablement. Mais on sait (CHEN et OSBORNE, 1970) que durant les premières 24 heures, il n'y a pas de transcription de nouveaux ARN messagers et que la synthèse protéique, corrélative à une formation rapide de polysomes, est programmée par des ARN messagers à longue vie, déjà transcrits et conservés dans l'embryon sec (GUITTON, 1968). A partir du second jour, il se forme de nouveaux ARN messagers qui prennent alors en charge la synthèse des protéines déjà amorcée. Cette transcription pourrait être la conséquence d'une activation des gènes correspondants, notamment, d'une libération des sites de l'ADN par certaines histones. Ce phénomène s'accompagne cependant d'une part, de la dégradation de divers constituants des tissus de réserve qui permet d'assurer la nourriture de l'embryon, d'autre part, de la synthèse des jeunes tissus de la plantule.

L'évolution des histones isolées du grain total et de la plantule au cours des différents stades de la germination, devrait donc traduire la résultante des phénomènes précédents.

Qu'en est-il en réalité? Nos résultats montrent effectivement que durant les premières 24 heures, la constitution de l'histone n'est pas modifiée, ce qui s'accorde avec les observations de CHEN et OSBORNE (1970) et de GOFSHTEIN (1968). Par la suite, plusieurs composants disparaissent et si, à partir du grain total il n'est pas permis de suivre le comportement des histones $F_1$, la germination de l'embryon met en évidence la disparition précoce de ces composants (2è jour).

Cela semblerait venir à l'appui des travaux de HUANG et BONNER (1965), BONNER (1967), JOHNS et FORRESTER (1970), qui mettent en évidence l'aptitude particulière des histones $F_1$ à participer au contrôle de l'expression des gènes. L'enlèvement de ces fractions les plus mobiles produit en effet, in vitro, de nettes modifications d'activité.

L'extrapolation aux phénomènes in vivo, doit cependant se faire avec une grande prudence pour les raisons suivantes:

- l'efficacité de la répression ou de la dérépression est souvent appréciée en mesurant l'effet de précipitation de l'ADN. Or, in vivo, les phénomènes sont certainement compliqués par la présence d'autres constituants que l'ADN et les histones.

- si le mécanisme de la répression est aisément concevable, celui de la dérépression pourrait être beaucoup plus complexe: au lieu d'une simple libération des sites devant être activés, on peut imaginer des processus où les histones seraient seulement modifiées par exemple, par phosphorylation de la sérine ou acétylation de la lysine (cas de $F_2a_1$) ou par thiolation (cas de $F_3$). On peut également, concevoir que les protéines non-histones de la DNP jouent un rôle antagoniste de celui des histones (en activant, par leur présence, certaines séquences de l'ADN, sans qu'il y ait élimination des histones.

En conséquence, malgré la netteté de la disparition des composants $F_1$ après 48 heures de germination de l'embryon, disparition qui irait dans le sens d'une dérépression par libération pure et simple des sites de l'ADN, il reste difficile de conclure à partir de ces simples observations. La compréhension d'un tel phénomène certainement très complexe nécessiterait vraisemblablement des études particulières plus approfondies.

Par ailleurs, nous avons cherché à expliquer la disparition progressive des composants $F_2b$ et $F_2a_2$, puis $F_2a_1$, particulièrement nette dans le grain total (fig. 37 a). Ce phénomène ne semble pas lié aux mécanismes d'activation des gènes, car, d'une part, les fractions riches en arginine n'interviennent habituellement pas à ce niveau, et, d'autre part, leur perte, contrairement à celle des histones $F_1$, s'accompagne de l'apparition d'un composant très rapide. La présence de celui-ci, généralement considérée comme l'effet d'une hydrolyse (PANYIM et CHALKLEY 1969), pourrait signifier que ces histones sont en cours de dégradation dans la DNP elle-même. Pour les histones $F_1$, il s'agirait plutôt d'une séparation entraînant l'élimination de ces fractions, sans hydrolyse, lors de la purification de la DNP.

L'hypothèse d'une dégradation enzymatique des histones $F_1$ durant le 2è jour de germination, ne peut cependant être exclue, car, dans l'ensemble, la disparition des divers composants a lieu dans un ordre inverse de celui des affinités pour l'ADN. Or les fractions riches en lysine sont, en effet, toujours les premières à être détachées de la DNP en cas de trypsinisation in vitro (DESVEAUX-CHABROL, 1968).

Finalement, après 3 jours de germination, les protéines isolées ne correspondent plus qu'aux fractions contaminantes de l'histone (globulines nucléaires). Le composant migrant au niveau de $F_1c$ pourrait également faire partie de cette catégorie, car il accompagne toujours plus ou moins les bandes 8-9 (cf. fig. 33).

Dans le cas de la germination du grain total, on a vérifié que les tissus jeunes (gemmules et radicules) ne représentent, pondéralement, qu'une faible proportion du matériel dont on extrait les histones. Dans ces conditions, les histones de gemmules et de radicules n'apparaissent pas sur les diagrammes de la plantule totale car elles sont masquées par celles du grain. En revanche, si l'on décompose la plantule de 5 jours en gemmules, radicules et grain résiduel, on observe que si les histone de ce dernier s'identifient à celles de la plantule totale, celles des gemmules et radicules apparaissent très différentes. Leurs diagrammes comportent en effet, essentiellement des fractions rapides ($F_2a$ et $F_2b$) et semblent être dépourvues de composants $F_1$ (fig. 37 b), tout comme le très jeune grain (fig. 35).

Dans le cas de la germination de l'embryon isolé (fig. 38), pour lequel les histones de tissus nouvellement synthétisés ne sont plus masquées par celles du grain résiduel, on observe effectivement, au 4è jour, une réapparition des constituants rapides, s'apparentant à ceux de la gemmule et de la radicule.

Les études parallèles du grain total et de l'embryon isolé permettent donc des observations complémentaires l'une de l'autre. Avec toute la prudence qui doit accompagner ce genre d'interprétation, il semble que les phénomènes observés au cours des différentes phases de la germination laissent entrevoir certains aspects du rôle fonctionnel possible des divers constituants de l'histone du grain.

## 3.6 - INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS EXTERNES

Nous avons comparé les histones de germes de variétés de blés cultivées dans différentes conditions de lieu et de fertilisation azotée:

- 3 échantillons de chacune des variétés Major et Gaillard en provenance de 3 lieux de culture différents: Beauce (B), Nièvre (N), Picardie (P).

- 3 variétés: Major, Dragon, Magdaléna, de même origine culturale, ayant reçu respectivement 2 doses différentes d'azote (80 et 180 unités/ha).

Les germes ont été isolés dans les conditions décrites § 2.1.2, à un degré de pureté voisin de 90 %. Comme précédemment, l'isolement des histones n'a pas posé de problème particulier, si ce n'est que les diagrammes d'électrophorèse comportent les deux bandes de globulines nucléaires habituelles, apportées par les impuretés du germe.

A titre d'exemple, les diagrammes électrophorétiques des histones isolées de blés provenant de plusieurs lieux de culture, sont présentés sur la figure 39.

L'examen de ce diagramme montre une remarquable stabilité de la constitution des histones. Il en est d'ailleurs de même lorsqu'il s'agit de blés ayant reçu différents apports d'azote.

De toute évidence et dans la limite de nos observations, les facteurs externes examinés semblent n'apporter aucune modification à la constitution protéique des histones.

## 3.7 - INFLUENCE DES CARACTERISTIQUES GENETIQUES

Après avoir examiné quelques aspects physiologiques, il était naturel de vérifier si les caractéristiques génétiques des blés ne risquaient pas d'influer à leur tour sur la constitution des histones, d'où l'idée de comparer les diagrammes de différents types de blés.

Les conclusions que l'on pouvait attendre de cette étude, à son origine, étaient fondées sur l'hypothèse d'une spécificité de l'histone elle-même ou de certains de ses composants, problème encore mal expliqué il y a seulement quelques années. Or, durant l'avancement de ce travail, d'importants résultats, publiés par les équipes américaines, ont au contraire apporté la preuve irréfutable du caractère peu spécifique et peu évolutif de l'histone. Notre étude, alors étendue à quelques autres espèces et genres de céréales, devait aboutir à des observations similaires.

Afin de pouvoir disposer de diagrammes histones aussi représentatifs que possible, les expériences dont nous indiquons ci-dessous les résultats, ont été réalisées intentionnellement à partir de germes, dans tous les cas où le matériel était disponible en quantités suffisantes.

C'est ainsi que 27 variétés de Triticum aestivum, 6 de Triticum durum, 1 de Triticum compactum ont été examinées à partir d'environ 5 grammes de germes.

Dans les cas où la préparation des germes s'est avérée impossible, l'isolement des histones a été effectué à partir des grains totaux dans les conditions décrites (§ 3.3.3). Le progéniteur supposé de l'espèce T. aestivum: Aegilops squarrosa (détenteur du seul génôme D), ainsi que deux autres céréales du genre Secale (seigle) et Hordeum (orge) ont été examinés dans ces conditions.

### 3.7.1 - Histones isolées de germes de différents types de blés:

#### 3.7.1.1 - Variétés de l'espèce T. aestivum:

Ces échantillons étaient originaires, soit de France, soit des U.S.A.

Parmi les variétés américaines, nous avons retenu un échantillonnage aussi représentatif que possible des types de blés cultivés dans ce pays:

- 2 blés de printemps: Selkirk, Conley (Hard red spring)
- 5 blés d'hiver: Bison, E. Triumph (Hard red winter), Lucas, Trumbull (Soft red winter), Brevor (Soft white).

Parmi les variétés françaises, on a également retenu un

ensemble de blés de caractéristiques génétiques et technologiques aussi différentes que possible.

- 11 variétés d'hiver: Capitole, Cappelle, Champlein, Etoile de Choisy, Gaillard, Joss, Ouest-Desprez, Splendeur (classées, selon le vocabulaire technologique, dans la catégorie des blés "faibles" et "moyens"); Magdaléna, Major, Wimax (appartenant à la catégorie des blés dits "de force").

- 9 variétés de printemps: Capta, Ch. Péguy (blés"moyens"), Aronde, Atys, Clairon, Kolibri, Germinal, Progress, Rex (blés "de force").

Toutes ces variétés ont été examinées et, à titre d'exemple, nous présentons (fig. 40) les diagrammes d'histones des variétés les plus représentatives: 6 d'origine française et 6 d'origine américaine.

3.7.1.2 - Variétés des espèces T. durum et T. compactum:

Pour T. durum, nous disposions de 4 variétés d'origine française (Montferrier, Bidi 17, Lez, 5 BD 391) et de 2 variétés d'origine américaine (Wells, Lakota). L'espèce T. compactum (type Club, variété Omar) provenait également des U.S.A.

Les diagrammes électrophorétiques des histones correspondant à 6 de ces 7 variétés sont présentés sur la figure 41.

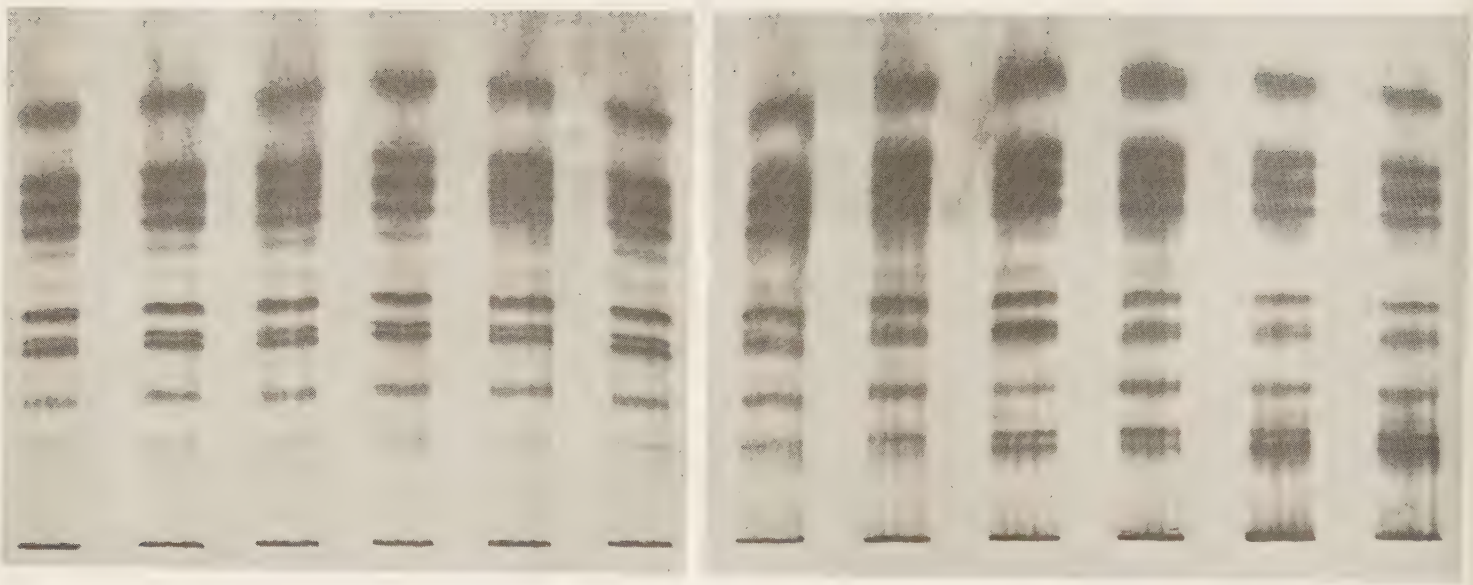
3.7.2 - Histones isolées des grains d'Aegilops squarrosa, de seigle et d'orge

L'espèce squarrosa, diploïde, du genre Aegilops, détentrice du génome D, est considérée par la plupart des généticiens, comme l'un des progéniteurs des variétés actuelles hexaploïdes (génomes A, B, D) couramment cultivées (blés tendres) alors que les variétés de blés durs tétraploides (génomes A, B) ne contiennent pas ce génome D. Il était donc intéressant d'examiner particulièrement, à côté des espèces précédentes, l'un des progéniteurs diploïdes des variétés actuelles de blés tendres et d'y adjoindre, à titre de comparaison, deux autres types de céréales couramment cultivées.

Les diagrammes électrophorétiques des histones de ces différents matériels sont présentés sur la figure 42, ainsi que, pour permettre de mieux comparer, ceux d'une variété T. durum (Lakota) et d'une variété T. aestivum (Cappelle), l'extraction de ces histones étant dans tous les cas effectuée à partir du grain total.

3.7.3 - Discussions:

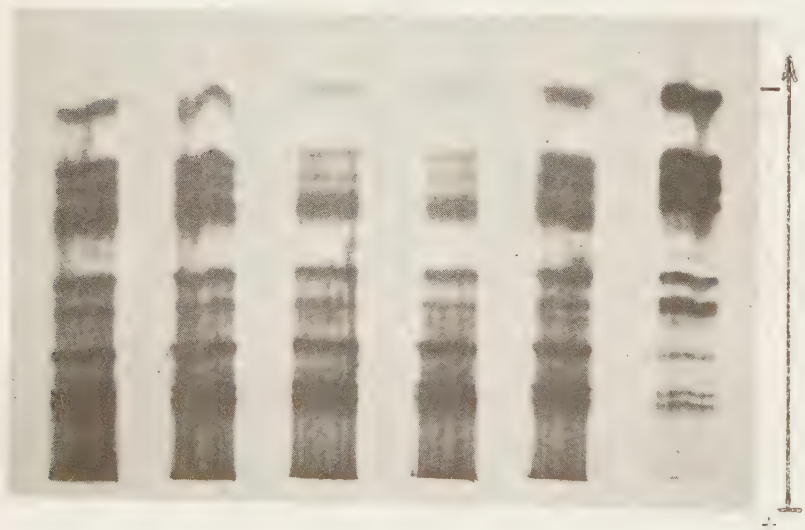
- Au niveau de Triticum aestivum, les histones des 12 échantillons examinés (fig. 40) présentent une très grande similarité de constitution sur le plan qualitatif. Tout au plus peut-on noter, et seulement pour le composant le plus lent (N° 9), "non-histone", un dédoublement chez les variétés américaines alors que chez



(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12)
H H H P P H H H H H P P

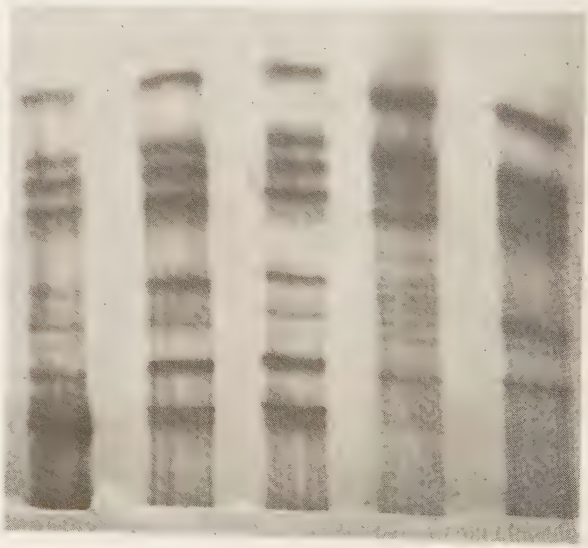
Blés faibles et moyens — Blés de force élevée — Blés "soft" — Blés "hard"

Figure 40: Diagrammes électrophorétiques des histones isolées de germes de différentes variétés de Triticum aestivum français et américains: H = blé d'hiver; P = blé de printemps. Variétés françaises: (1) JOSS; (2) CAPPELLE; (3) CAPITOLE; (4) PROGRESS; (5) ATYS; (6) MAGDALENA; variétés américaines: (7) BREVOR; (8) LUCAS; (9) TRUMBULL; (10) E. TRIUMPH; (11) SELKIRK; (12) CONLEY.



(1) (2) (3) (4) (5) (6)

Figure 41: Diagrammes électrophorétiques des histones isolées de germes de différentes variétés de Triticum durum: (1) MONTFERRIER; (2) BIDI 17; (3) LEZ; (4) [illegible]LLS; (5) LAKOTA; et de Triticum compactum: (6) OMAR.



(1) (2) (3) (4) (5)

Figure 42: Diagrammes électrophorétiques des histones isolées de grains de différentes céréales: (1) T. durum; (2) Aegilops squarrosa; (3) T. aestivum; (4) Secale cereale; (5) Hordeum vulgare.

les variétés d'origine française, cette bande reste quasiment unique.

Ainsi, ni la nature génétique, ni l'origine culturale, ni le fait qu'il s'agisse de blés d'hiver ou de printemps, de blés "forts" ou de blés "faibles", n'apparaissent modifier la constitution des histones.

- Pour ce qui est des variétés de Triticum durum (fig. 41), on aboutit absolument aux mêmes constatations.

Si la comparaison porte à la fois sur T. aestivum, T. durum et T. compactum, les diagrammes apparaissent presque identiques. Toutefois, de légères dissemblances peuvent être observées. Ainsi, au niveau des globulines nucléaires, non-histones, le composant le plus lent (N° 9) apparaît nettement renforcé et dédoublé chez T. durum comparativement à T. aestivum et T. compactum.

Au niveau des histones elles-mêmes, la proportion relative des composants très mobiles (types $F_2a$ et $F_2b$) apparaît plus faible chez T. durum que chez T. aestivum et T. compactum. Selon ce critère, il semblerait que les T. aestivum d'origine américaine constituent un cas intermédiaire, les variétés les plus vitreuses (Conley, Selkirk) s'apparentant davantage aux T. durum, les variétés les plus farineuses (Brevor, Lucas) étant au contraire plus proches des T. aestivum français et du T. compactum.

Peut-on considérer que ces légères dissemblances expriment des différences de nature génétique? Cette question reste sans réponse dans la limite des observations effectuées.

- En ce qui concerne le progéniteur Aegilops squarrosa (génome D) comparé aux espèces tétraploïdes (génomes A, B) et hexaploïdes (génomes A, B, D), la constitution des histones ne fait pas davantage apparaître de différences qualitatives. Si on s'en réfère à la proportion relative des différents composants, l'histone d'Aegilops squarrosa semble plus proche de T. aestivum que de T. durum.

Des différences plus facilement observables ressortent des diagrammes relatifs aux deux autres céréales, seigle et orge, et semblent porter principalement sur le groupe des composants $F_1$. A ce niveau, il apparaîtrait que l'histone du seigle soit plus complexe que celle des blés et celle de l'orge. Quant aux fractions de types $F_2a$ et $F_2b$, on ne note aucune différence entre les trois céréales.

L'ensemble de nos résultats semble donc traduire une remarquable stabilité des histones au niveau des variétés, des espèces et même de plusieurs genres de céréales, donc une spécificité très limitée de ces protéines. De plus, les seules différences minimes pouvant être décelées, en supposant qu'elles soient significatives, portent sur les fractions de type $F_1$.

Ces constatations infirment celles rapportées par YAMALEEVA (1970), selon lesquelles les histones isolées de plantules de différentes espèces de Triticum présenteraient des constitutions non identiques avec 20 à 26 composants selon le cas.

Or une telle complexité n'a été confirmée par aucun travail récent (cf. § 3.2.5 et fig. 23 et 33), ce qui peut laisser supposer que les différences signalées soient le fait de composants non-histones contaminant les préparations. Cela rejoindrait nos observations au niveau des globulines nucléaires. Plus récemment YAMALEEVA (1972) et YAMALEEVA et al. (1972) reconnaissent d'ailleurs, sur la base de 9 composants véritablement de nature histone, que T. monococcum et T. aestivum sont semblables et que même entre seigle, blé et triticale les différences sont minimes.

Contrairement à quelques travaux déjà anciens (JOHNS et BUTLER, 1962 VENDRELY et VENDRELY, 1965) qui envisageaient une certaine spécificité génétique pour les histones, nos résultats concernant le blé tendent à confirmer l'idée d'une grande stabilité de constitution globale de ces protéines entre différentes espèces.

Les études les plus récentes entreprises tant au niveau des vertébré (PANYIM et al., 1971 a, b; SAUTIERE et al., 1972; DE LANGE et al., 1972) que des insectes (PALLOTTA et BERLOWITZ, 1970; OLIVER et CHALKLEY, 1972) ou que des végétaux (DE LANGE et al., 1969 b; SMITH et al., 1970; MANDAL et al., 1971), s'accordent en eff à reconnaître la grande similarité des histones isolées de ces différents organismes.

D'autre part, nos observations relatives aux composants histones eux-mêmes rejoignent celles rapportées par SMITH et al. (1970), PANYIM et al. (1971 a) et SAUTIERE et al. (1972): la spécificité des fractions $F_2a_1$ et $F_3$ (dont même la séquence des acides aminés semble quasi universelle) serait nulle, celle de $F_2a_2$ et $F_2b$ serait limitée au niveau des familles des ordres ou des classes, celle de $F_1$ serai plus élevée.

Précisément, dans notre étude sur le blé, il apparaît une stabilité du type $F_2a_1$ et certaines différences au niveau de $F_1$. Par contre, nous ne notons pas de variations au niveau de $F_2a_2$ et $F_2b$, ce qui pourrait s'expliquer par la trop faible différenciation des types botaniques examinés. Pour observer des variations au niveau de ces derniers composants, il faut vraisemblablement toujours s'adresser à des végétaux de familles ou de genres différents.

En conclusion, il apparaît que l'étude de la constitution des histones ne peut avoir en génétique, un intérêt appliqué qu'au niveau de la sélection d'un matériel obtenu par des hybridations éloignées. En revanche, ce procédé ne permet pas de différencier significativement les variétés. Bien que de meilleurs résultats soient à attendre d'une étude des seules fractions $F_1$ préalablement isolées, éventuellement complétée d'analyses immunochimiques, le problème relatif à la caractérisation biochimique des variétés, ne pourra être résolu, chez le blé, que par l'intermédiaire de protéines plus spécifiques, comme semblent l'être apparemment les gliadines (BOURDET et al., 1963; FEILLET et BOURDET, 1967).

## 3.8 - CONCLUSIONS RELATIVES AUX ASPECTS PHYSIOLOGIQUES DE LA CONSTITUTION DES HISTONES

Le mécanisme d'action des histones apparaît extrêmement complexe et demeure loin d'être élucidé. A partir des simples expériences rapportées dans cette partie physiologique de notre étude, nous ne pouvions évidemment pas parvenir à des conclusions nettes et définitives sur cette question, d'autant que le grain de blé, dans lequel les tissus de réserve prédominent, constitue un matériel d'étude particulièrement complexe. Cependant, compte tenu de nos observations sur le plan physico-chimique chez le blé, nous pouvions tenter de dégager quelques aperçus du rôle possible des histones, puis discuter aussi largement que possible nos observations à la lumière de travaux antérieurs de nature physiologique, fondés généralement sur des expériences très approfondies.

Il s'agissait tout d'abord, de répondre à la question: la constitution des histones est-elle modifiée -et de quelle façon- au cours des transformations physiologiques qui affectent le grain?

L'analyse des résultats obtenus a montré, qu'indubitablement, la constitution physico-chimique des histones est influencée par plusieurs transformations du grain. Mais les histones ne sont pas des protéines de réserve qui subiraient l'évolution générale du matériel biologique. Leur localisation intracellulaire au niveau des chaînes d'ADN, prouve leur caractère fonctionnel et permet de penser qu'elles exercent certaines responsabilités d'ordre physiologique. Ces modifications de leur constitution électrophorétique ne sont pas le résultat des transformations du grain, mais constituent, au contraire, une image témoin de leur intervention dans l'expression des informations portées par l'ADN, image qui permet de préciser quelque peu la nature de leur véritable fonction.

Ainsi, pour se limiter à des exemples très significatifs, durant la maturation du grain, on observe un accroissement de la quantité d'histones présentes, lié à une augmentation de la complexité des diagrammes. De même dans les tissus à métabolisme intense (radicule, gemmule), on trouve moins d'histone totale et moins de composants histones que dans un organe à vie ralentie comme l'embryon du grain. Ces seules données permettent de se représenter les histones comme des agents répresseurs ou inhibiteurs de certains mécanismes biologiques.

Les travaux rapportés ici se situent donc dans la série de ceux, qui, depuis STEDMAN et STEDMAN (1950) tendent à démontrer l'intervention des histones dans la régulation ou le contrôle de l'expression des gènes. Cependant, s'il est concevable qu'une association des histones de l'ADN rende ce dernier inactif pour la transcription, le détail du mécanisme de la répression est infiniment plus difficile à expliquer. En effet, une spécificité des histones au niveau des tissus et des espèces eut constitué un système logique de répression de l'ADN dans des cellules spécialisées. Or, les

expériences concernant l'influence des caractéristiques génétiques, nous ont montré la très faible spécificité des histones au niveau des genres et espèces de céréales et l'absence totale de ce caractère au niveau des variétés.

Il doit donc nécessairement exister un mécanisme autre -et plus complexe- que la spécificité de structure primaire, pour certaines séquences de l'ADN, des espèces moléculaires histones. L'étude détaillée des composants histones permet d'ailleurs d'apporter quelques premières précisions sur ce sujet.

Ainsi, contrairement à l'étude des fractions $F_2a_2$ et $F_2b$ pour lesquelles la faible spécificité et l'absence de caractère très original n'ont pas permis de suggérer de fonction précise, celle des fractions $F_1$, $F_2a_1$ et $F_3$ s'est révélée plus prometteuse:

- les histones $F_1$ de composition très particulière en acides aminés, faiblement liées à l'ADN et donc aisément séparables, sont aussi caractérisées par une spécificité génétique relativement élevée. Leur absence dans les organismes primitifs, ainsi que dans les premiers stades du développement, suggère qu'elles sont vraisemblablement les plus directement impliquées dans le blocage de certains gènes. Mais seule la mise en évidence de la nature exacte des liaisons et des groupements chimiques intervenant, pourrait constituer une véritable démonstration. Jusqu'ici, on pense que l'interaction avec l'ADN pourrait être le fait de la partie basique C-terminale, l'extrémité apolaire-N-terminale étant libre pour les interactions avec d'autres protéines. Les différents degrés de phosphorylation de la région C-terminale pourraient alors expliquer la spécificité éventuelle de la répression.

- les histones $F_2a_1$ ont une spécificité pratiquement nulle. Leur structure primaire s'est conservée durant l'évolution et la différenciation des espèces. Cette remarquable stabilité, qui n'a pas d'équivalent dans la nature, ne peut donc qu'être liée à une importance fondamentale de ces protéines et notamment au caractère fonctionnel de la totalité de leur molécule. Comme la seule donnée biochimique n'ayant pas varié durant l'évolution est la configuration hélicoïdale des groupements phosphates, sucres et bases de l'ADN, on attribue aux histones $F_2a_1$ une fonction d'agent complexant hautement spécifique de cette structure, de sorte que les variations observées quant au degré de méthylation de la lysine et d'acétylation pourraient être en rapport avec les modifications de structure de la chromatine nécessitées par les changements d'état fonctionnel de la cellule.

- les histones $F_3$ également très peu spécifiques et peu évolutives, auraient des fonctions semblables aux types $F_2a_1$ mais possèdent en outre, la propriété de se dimériser ou de polymériser. La signification de cette propriété n'est pas connue, mais on suppose qu'elle est en relation avec les changements d'état de la chromatine qui accompagnent par exemple la division cellulaire.

Une étude des seules fractions histones est cependant insuffisante pour expliquer le blocage de certaines séquences de l'ADN. En effet, on considère actuellement que les histones sont nécessaires pour masquer quantitativement l'ADN de la chro-

matine, mais que leur effet notamment dans le cas des $F_1$, n'est probablement pas spécifique, d'où la nécessité de rechercher le véritable agent spécifique. Comme par ailleurs, la reconstitution exacte de la chromatine après dissociation n'est possible qu'en milieu urée 5 M, il a été suggéré que l'agent en question pourrait être un ARN chromosomal (HUANG et BONNER, 1965) lié aux histones ou aux protéines non-histones. La reconnaissance des sites spécifiques se réaliserait alors par une hybridation de cet ARN avec des séquences de nucléotides de l'ADN.

Les histones ne contribueraient donc pas réellement à la spécificité de la répression, celle-ci n'étant possible que grâce aux protéines non-histones et à l'ARN chromosomal, éventuellement associés sous forme de ribonucléoprotéines (WILHELM et al., 1971). Il apparaîtrait donc que les histones n'aient pas, par elles-mêmes, la fonction de régulateurs, mais plutôt de moyen, d'outil de cette régulation. Leur faible spécificité autoriserait leur utilisation pour bloquer n'importe quel site, ce qui leur confèrerait un rôle essentiellement passif.

Selon l'image de BUSCH (1965), la cellule vivante est un orchestre susceptible de produire un très grand nombre de notes mais qui, comme tout orchestre, n'utilise pas simultanément toutes ses possibilités. Dans cet ensemble, les histones pourraient représenter les doigts des musiciens, mais il est encore impossible de dire qui, y tiendrait le rôle des musiciens et surtout celui du chef d'orchestre.

De nombreux travaux physiologiques et biochimiques mettant en oeuvre des moyens plus importants et des techniques plus complexes et efficaces que les nôtres, notamment l'établissement de séquences des acides aminés, la reconstitution de la chromatine, l'emploi d'enzymes de synthèses de l'ADN et des ARN, l'hybridation des acides nucléiques,... seront encore nécessaires pour parvenir à élucider ces délicates questions.

# CONCLUSIONS GENERALES

Si les désoxyribonucléoprotéines (DNP) et les histones ont fait l'objet de nombreuses recherches dans le domaine animal, il n'en est pas de même pour les végétaux. Nos connaissances sur les DNP et sur les histones, qui ont connu un développement vraiment appréciable seulement dans les cinq dernières années, restent encore très fragmentaires et limitées. Elles concernent surtout les tissus à forte activité métabolique, mais aucune étude physico-chimique approfondie n'a, jusqu'à ce jour, été consacrée aux tissus de réserve tels que les graines de céréales.

Le cas particulier du grain de blé que nous avons choisi d'étudier, a soulevé effectivement de nombreuses difficultés d'ordre expérimental, et c'est en nous appuyant principalement sur les recherches du domaine animal que ce travail a pu être mené à son terme.

Comme nous l'avons d'abord montré, le grain de blé contient entre 0,20 et 0 25 % d'acides nucléiques, la part revenant à l'ADN lui-même étant de 40 %. Cet ADN se répartit approximativement entre les différentes régions du grain à raison de 45 % pour l'albumen, de 30 % pour les enveloppes externes et de 25 % pour le germe. Bien qu'il ne constitue en poids que 2 % du grain, le germe apparaît particulièrement riche en ADN (1 %) comparativement aux tissus périphériques (0,15 %) et à l'albumen (0,05 %) et constitue donc un matériel de choix pour l'étude des DNP et des histones.

Les préparations de DNP isolées du germe, qui rassemblent plus de 80 % des DNP présentes, contiennent 40 % d'ADN, 1,5 % d'ARN et 58 % de protéines dont les 4/5 sont de nature histone. Les protéines dites résiduelles, formant l'autre 1/5, s'en différencient par plusieurs de leurs caractéristiques.

Cette composition nucléique et protéique globale apparait assez proche de celle d'autres types connus de DNP animales ou végétales. Il en est apparemment de même pour différentes autres caractéristiques (aspect, solubilité, spectre UV). On note toutefois que les DNP isolées des tissus de réserve plus complexes ont un aspect granuleux et une teneur plus faible en ADN (20 à 36 %). La présence de DNP dans ces tissus de réserve correspondrait aux vestiges des constituants nucléiques des jeunes cellules progressivement transformées en cellules de réserve au cours de la maturation du grain.

En ce qui concerne le germe, différents arguments d'ordre expérimental nous autorisent à admettre que les préparations isolées dans les conditions décrites ne sont pas des combinaisons fortuites entre l'ADN et diverses protéines mais bien des nucléohistones dont l'intégrité moléculaire a été respectée. Pour ce qui est des

DNP originaires des tissus de réserve, nous ne pouvons être aussi affirmatifs compte tenu des différences observées.

L'histone totale acido-soluble isolée dans une deuxième phase des DNP convenablement purifiées, présente certaines analogies avec les autres histones déjà connues. Elle se caractérise également par une absence des acides aminés soufrés et une prédominance en lysine et en arginine. Toutefois, la constitution protéique, définie par le comportement électrophorétique, met en évidence son originalité: comparativement à l'histone de thymus, la plus étudiée, qui se résout en 4-5 composants, l'histone de germe apparait formée de 7 composants. Cette hétérogénéité limitée est analogue à celle rapportée récemment chez le seigle et le pois.

L'isolement par précipitation fractionnée et chromatographie des 4 principaux composants de l'histone, met en évidence leur individualité. La détermination de leurs principales caractéristiques physico-chimiques (charge électrique, apolarité, affinité pour l'ADN, composition en acides aminés, spectres UV) permet d'autre part, de les identifier aux fractions classiques $F_1$, $F_2a_1$, $F_2a_2$, $F_2b$, du thymus, telles qu'elles ont été définies dans la nomenclature de JOHNS. Le composant assimilé à $F_1$ ne manifeste cependant pas toutes les propriétés particulières qui lui sont attribuées d'ordinaire, alors que la fraction $F_3$, très fortement liée à l'ADN dans la plupart des histones connues, ne serait présente qu'à l'état de trace chez le blé. Dans l'ensemble, les composants de l'histone de blé sont donc physico-chimiquement moins différenciés que ceux rencontrés chez les autres types d'histones. On dispose actuellement de trop peu d'informations dans le domaine végétal pour expliquer les différences observées au niveau de l'histone entre le blé et d'autres organismes tels que le seigle, le riz, le pois.

Les observations ainsi rassemblées sur la constitution protéique des histones du germe, nous ont amenés à examiner les modifications éventuellement apportées à ce niveau par certaines transformations de nature essentiellement physiologique.

Ainsi, les histones isolées des tissus du grain autres que le germe, présentent une constitution protéique similaire, les diagrammes apparaissant qualitativement identiques à ceux de l'histone de germe. On observe néanmoins, la présence de deux composants supplémentaires de faible mobilité. Leur isolement et leur analyse, notamment leur composition en acides aminés, montrent qu'il s'agit de protéines contaminantes non-histones, du type globulines nucléaires, originaires du suc nucléaire. La fixation de telles protéines basiques sur l'ADN au cours des opérations d'extraction semble être particulière aux tissus de réserve et ne s'observe pas lorsque le matériel de départ est constitué de germe purifié.

Sur le plan quantitatif, il semble bien que les fractions histones du type $F_1$ aient une importance relative supérieure dans les tissus différenciés tels que l'albumen, par rapport aux tissus embryonnaires tels que le germe. Cette observation traduit vraisemblablement l'intervention des histones $F_1$ riches en lysine et en alanine dans la répression de certains gènes nécessitée par la différenciation ou le

ralentissement de l'activité des cellules.

Il existe d'autre part, certaines relations entre les histones du blé et les 4 types protéiques classiques définis par OSBORNE selon le tissu considéré. C'est ainsi que les globulines de l'albumen rassembleraient la majeure partie des histones de cette région du grain, alors que celles du germe contiennent principalement des constituants ribonucléoprotéiques. A l'inverse, les protéines de réserve de type gluténines isolées du germe, contiendraient 17 % d'histone alors que la fraction homologue de l'albumen en est dépourvue. On note d'autre part, l'absence totale d'histone dans les fractions du type albumines et gliadines. La présence ou l'absence d'histone dans les globulines ou les gluténines isolées soit du germe, soit de l'albumen, sembleraient provenir d'une différence d'accessibilité de ces deux tissus aux solvants d'extraction, elle-même la conséquence d'une différence de structure histologique.

Par ailleurs, lors de la maturation du grain, il apparaît que les fractions $F_2a$ et $F_2b$ demeurent constantes tout au long du développement, alors que celles du type $F_1$ n'apparaissent au niveau des DNP qu'à partir d'un certain stade (environ 30 jours après la fécondation).

Cela semble impliquer que les composants $F_2a$ et $F_2b$ n'interviendraient pas dans le métabolisme, mais pourraient avoir dès les premiers stades, un rôle essentiellement structural au niveau des DNP. Au contraire, le type $F_1$ interviendrait à un stade du développement correspondant à un ralentissement des synthèses dans le grain, ce qui laisserait supposer son intervention dans la répression de l'activité de certains gènes.

Alors que l'augmentation progressive du nombre des composants histones accompagne un ralentissement du métabolisme dans le phénomène de maturation, la germination entraîne leur diminution rapide.

Les diagrammes histones obtenus à partir du grain total, et plus spécifiquement à partir d'embryons isolés, en cours de germination, présentent des caractéristiques qui sont la résultante de deux types de phénomènes: dégradations et synthèses.

La disparition de certaines fractions de type $F_1$ ($F_1a$ et $F_1b$) pourrait être reliée à l'initiation de nouvelles synthèses au niveau de l'embryon, elles-mêmes associées à l'activation de certains gènes. La disparition des autres fractions ($F_2a$ et $F_2b$), les plus importantes quantitativement, qui est en rapport direct avec l'abaissement rapide du taux d'histone totale pouvant être isolée, résulterait de phénomènes plus généraux de protéolyse associés à la germination.

En outre, si l'on considère séparément les tissus de la jeune plantule (radicules et gemmules), on constate la présence de fractions de types $F_2a$ et $F_2b$ et l'absence de fractions de type $F_1$, ce qui est confirmé par le diagramme fourni au 4è jour de germination par l'embryon lui-même. Cela vérifierait le rôle déjà signalé

attribué à ces fractions $F_1$, qui s'accentuent lorsqu'il y a ralentissement du métabolisme, mais qui tendent à disparaître lorsque l'activité métabolique des tissus s'accroît.

Quant à certains facteurs externes tels que l'origine culturale et l'apport d'une fertilisation azotée au cours du développement de la plante, ils apparaissent n'exercer aucune influence sur la constitution protéique de l'histone de germe de blé, la même constatation s'appliquant à plusieurs variétés. Effectivement, la comparaison des histones de germes provenant de variétés ou d'espèces différentes de blés montre une très grande similarité de constitution et en conséquence, une très faible spécificité. Nos conclusions, qui confirment ainsi celles présentées dans de récents travaux sur divers organismes animaux et végétaux, montrent donc une remarquable stabilité des histones au niveau des différents types de végétaux examinés.

Ce caractère fondamental et unique, qui traduit apparemment une modification évolutive très limitée, est particulièrement marqué pour les fractions riches en arginine $F_2a_1$ et $F_3$. Celles-ci sont certainement sous la dépendance de gènes ne tolérant des modifications que dans des limites très étroites, toute autre mutation étant vraisemblablement létale. Nous devons donc admettre que les molécules d'histones sont liées à des structures communes à tous les organismes eucaryotes, ce caractère étant en relation avec une fonction biologique très particulière et fondamentale.

Si beaucoup de questions se posent encore sur cette fonction, notamment sur les détails du mécanisme de répression et de dérépression des séquences de nucléotides de l'ADN, la discussion de nos résultats à la lumière de différents travaux antérieurs semble mettre en évidence pour les histones, non pas un rôle de régulateurs spécifiques, mais plutôt d'exécutants passifs de cette régulation.

Cette faible spécificité des histones fait donc que leur connaissance physico-chimique ne semble guère utilisable pour des recherches d'ordre génétique qu'entre organismes suffisamment éloignés tels que des espèces, des genres ou des familles différentes.

En revanche, les histones se prêtent à d'intéressantes études physiologiques et nous pensons que le présent travail constitue, au niveau des céréales, une première base pour le développement de recherches ultérieures dans ce domaine.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


AUTRAN J.C., BOURDET A., 1970. Histones de germes et de farine de blé. C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D., 271, 22, 2050-2053.

AUTRAN J.C., BOURDET A., 1971 a. Constitution électrophorétique des histones de germes de différents types de blés. C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D., 272, 21, 2732-27

AUTRAN J.C., BOURDET A., 1971 b. La détermination des constituants nucléiques du blé et leur répartition dans le grain. Ann. Technol. agric., 20, 2, 179-183.

AVETISOVA L.V., 1970. Evolution des teneurs en ADN et en histones dans les régions apicales des plantules (en russe). Fiziol. Rastenii, 17, 5, 1052-1061.

ÄYRÄPÄÄ T., 1957. On the presence of nucleoproteins and lipoproteins in the salt-solubl protein fraction of barley. Acta Chem. Scand., 11, 9, 1565-1575.

BELOZERSKIJ A.N., ABELEV G.I., 1955. Le problème de l'unité de la structure chimique du matériel nucléaire des cellules végétales et animales (en russe). Vest. Moskov. Univ., Ser. Fiz.-mat. Estestv. Nauk. U.R.S.S., 6, 9, 103-108.

BEX J.H.M., 1972. Effects of abscissic acid on nucleohistone and histone synthesis in maize coleoptiles. Acta Bot. Neer., 21, 3, 292-300.

BHATTACHARYA P.K., NAYLOR J.M., SHAW M., 1965. Nucleic acid and protein changes in whea leaf nuclei during rust infection. Science, 150, 3703, 1605-1607.

BIJVOET P., 1957. Ethanol precipitation analysis of thymus histone. Biochim. Biophys. Acta, 25, 502-512.

BIRNSTIEL M.L., FLAMM W.G., 1964. Intranuclear site of histone synthesis. Science, 145, 1435-1437.

BISERTE G., 1959. Classification et étude particulière des protéines. In "Traité de biochimie générale" (JAVILLIER M., POLONOWSKI M., FLORKIN M., BOULANGER P., LEMOIGNE M., ROCHE J., WURMSER R.). Masson et cie., 1, 2, 4, 839-934.

BONNER J., 1967. The role of histones in the regulation of RNA synthesis. In "Regulation of nucleic acids and protein biosynthesis" (KONIGSBERGER V.V., BOSCH L.) Elsevier, Amsterdam, 211-224.

BONNER J., CHALKLEY G.R., DAHMUS M., FAMBROUGH D., FUJIMURA F., HUANG R.C., HUBERMAN J. JENSEN R., MARUSHIGE K., OHLENBUSCH H., OLIVERA B., WIDHOLM J., 1968. Isolation and characterisation of chromosomal nucleoproteins. In "Methods in enzymology" (COLOWICK S.P., KAPLAN N.O.). Academic Press, New-York, vol. 12, B, 3-65.

BONNER J., HUANG R.C., 1963. Properties of chromosomal nucleohistone. J. Mol. Biol., 6, 169-174.

BONNER J., HUANG R.C., 1966. The histones. Ciba Foundation Study Group, n° 24, 18. Churchill J. and A., Ltd, London.

BORKHSENIUS S.N., TUROVEROVA L.V., VINOKUROVA T.I., IL'INA I.D., VOROB'EV V.I., 1969. Solubilité et dissociation des complexes nucléoprotéiques chromosomaux (en russe). Mol. Biol., 3, 4, 507-517.

BOULTER D., DOUGLAS H.W., LAYCOCK M.V., 1965. The micro electrophoretic behaviour of nuclei and mitochondria of rat liver and wheat embryos. New Phytologist, 64, 3, 443-450.

BOURDET A., FEILLET P., 1967. Distribution of phosphorus compounds in the protein fraction of various types of wheat flours. Cereal Chem., 44, 5, 457-482.

BRADBURY E.M., CRANE-ROBINSON C., 1964. Physical studies on the molecular configurations of histone and of nucleohistone. In "The nucleohistones" (BONNER J., TS'O P.). Holden-day inc.,San-Francisco, 117-133.

BRIGGS A.P., 1922. A modification of the BELL-DOISY phosphate method. J. Biol. Chem., 53, 13-16.

BURTON K., 1956. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. Biochem. J., 62, 315-323.

BUSCH H., 1965. Histones and other nuclear proteins. Acad. Press, New-York.

BUTLER J.A.V., JOHNS E.W., PHILLIPS D.M.P., 1968. Recent investigations on histones and their functions. Progr. Biophys. Mol. Biol., 18, 209-244.

CHAUVEAU J., MOULE Y., ROUILLER C., 1956. Isolation of pure and unaltered liver nuclei. Morphology and biochemical composition. Exptl. Cell. Research, 11, 317-321.

CHEN D., OSBORNE D.J., 1970. Ribosomal genes and DNA replication in germinating wheat embryo. Nature, 225, 5230, 336-340.

CLEMENT Y., BUIS R., 1971. Protéines nucléaires basiques et croissance chez l'hypocotyle de Lupinus Albus L.. Planta (Berl.),97, 320-324.

COHN N.S., QUATRANO R.S., 1965. Extraction and analysis of histone protein from the roots of three plant species. Experientia, 21, 4, 237-240.

COIRAULT Y., TAN K.B., VENDRELY R., 1968. Emploi de divers supports solides pour l'étude électrophorétique des histones totales et de leurs fractions. International IV Symposium Chromatographie Electrophorèse. Presses Académiques Européennes, Bruxelles, 262-267.

CRUFT H.J., 1961. The fractionation of histones on Sephadex G-75. Biochim. Biophys. Acta, 54, 611-613.

CRUFT H.J., 1962. The electrophoresis of histones in polyacrylamide gels. Biochem. J., 84, 478-480.

CRUFT H.J., HINDLEY J., MAURITZEN C.M., STEDMAN E., 1957 a. Amino acid composition of the six histones of calf thymus thymocytes. Nature, 180, 1107-1109.

CRUFT H.J., MAURITZEN C.M., STEDMAN E., 1957 b. The nature and physico-chemicals properties of histones. Phil. Trans. Roy. Soc., London, Ser. B., 241, 93-145.

DAVISON P.F., JAMES D.W.F., SHOOTER K.V., BUTLER J.A.V., 1954. The histones of calf thymus DNP. II - Electrophoretic and sedimentation behaviour and a partial fractionation. Biochim. Biophys. Acta, 15, 415-424.

DE LANGE R.J., FAMBROUGH D.M., SMITH E.L., BONNER J., 1968. Calf and pea histone IV. I - Amino acid compositions and the identical COOH terminal 19 residue sequence. J. Biol. Chem., 243, 22, 5906-5913.

DE LANGE R.J., FAMBROUGH D.M., SMITH E.L., BONNER J., 1969 a. Calf and pea histone IV. II - The complete amino acid sequence of calf thymus histone IV. Presence of ε-N-acetyl lysine. J. Biol. Chem., 244, 2, 319-334.

DE LANGE R.J., FAMBROUGH D.M., SMITH E.L., BONNER J., 1969 b. Calf and pea histone IV. III - Complete amino acid sequence of pea seadling histone IV. Comparison with the homologous calf thymus histone. J. Biol. Chem., 244, 20, 5669-5679.

DE LANGE R.J., HOOPER S.A., SMITH E.L., 1972. Complete amino acid sequence of calf thymus histone III. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69, 4, 882-884.

DE LOZE C.T., 1958. Effet de l'hydratation sur le spectre infra-rouge de la nucléo-histone. C.R. Acad. Sci. Paris, 246, 599-601.

DERUMEZ P., MOSCHETTO Y., BISERTE G., 1968. Etude d'une protéine résiduelle attachée à l'ADN de thymus de veau. I - Composition en amino acides. Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 10, 1861-1863.

DICK C., 1968. Isolation of nuclei and histones from roots of Vicia faba. Arch. Biochem Biophys., 124, 431-435.

DOUNCE A.L., UMANA R., 1962. The proteases of isolated cell nuclei. Biochemistry, 1, 5, 811-819.

FAMBROUGH D.M., 1968. Studies on plant and animal histones. Diss. Abstr., 29, 3, 910 B- 911 B.

FAMBROUGH D.M., BONNER J., 1966. On the similarity of plant and animal histones. Biochemistry, 5, 8, 2563-2570.

FAMBROUGH D.M., BONNER J., 1968. Sequence homology and role of cysteine in plant and animal arginine-rich histones. J. Biol. Chem., 243, 17, 4434-4439.

FAMBROUGH D.M., FUJIMURA F., BONNER J., 1968. Quantitative distribution of histone components in the pea plant. Biochemistry, 7, 2, 575-584.

FAMBROUGH D.M., BONNER J., 1969. Limited molecular heterogeneity of plant histones. Biochim. Biophys. Acta, 175, 113-122.

FEILLET P., 1965. Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques. Ann. Technol. agric., 14, HS n° 1 1-94.

FEILLET P., BOURDET A., 1967. Composition protéique et caractéristiques génétiques des blés. Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 10, 1273-1283.

FEILLET P., BOURDET A., 1968. Les protéines solubles du blé. I - Isolement et caractérisation des albumines et des globulines. Ann. Technol. agric., 17, 3, 217-22

GOFSHTEIN L.V., 1967. Hétérogénéité des histones de germes de blés en période de dormance ou de germination (en russe). Biokhimiya, 32, 5, 959-963.

GOFSHTEIN L.V., 1968. Histones de germes de blés en période de dormance ou de germination (en russe). Biokhimiya, 33, 4, 823-830.

GOFSHTEIN L.V., 1970. Histones of dormant and germinating wheat germs (en russe). Kletochnoe Yadro Ego Ul'trastruktury, Mater. Vses. Simp. "Strukt. Funkts. Kletochnogo Yadra", 2nd 1968 (pub. 1970), 104-108.

GOFSHTEIN L.V., SAFONOV V I., SISAKYAN N.M., 1966. Hétérogénéité des histones de désoxyribonucléoprotéines de germe de blé (en russe). Dokl. Akad. Nauk. URSS, 167, 5, 1168-1170.

GOODWIN T.W., MORTON R.A., 1946. Determination of tyrosine and tryptophane in proteins. Biochem. J., 40, 628.

GORNALL A.G., BARDAWILL C.S., DAVID M.M., 1949. Determination of serum proteins. J. Biol. Chem., 177, 751.

GREWE E., LECLERCQ J.A., 1943. Commercial wheat germ. Its composition. Cereal Chem., 20, 423-434.

GUBLER E., BAUMANN T.W., WANNER H., 1971. Isolation und Auftrennung pflanzlicher Histone. Verh. Schweiz. Naturforsch. Ges., 151, 90.

GUITTON Y., 1968. Quelques aspects du métabolisme des acides ribonucléiques au cours de la germination des graines. Bull. Soc. Franç. Physiol. végét., 14, 1, 83-97.

HENSON P., WALKER I.O., 1970. The partial dissociation of nucleohistone by salts. Eur. J. Biochem., 14, 345-350.

HIMES M., 1967. Analysis of heterochromatin in maize root tips. J. Cell. Biol., 35, 175-181.

HNILICA L.S., BESS L.G., 1965. The heterogeneity of arginine-rich histones. Analyt. Biochem., 12, 421-436.

HNILICA L.S., EDWARDS L.J., HEY A.E., 1966. Studies on nuclear proteins. II - Quantitative distribution of histone fractions in various tissues. Biochim. Biophys. Acta, 124, 109-117.

HUANG R.C., BONNER J., 1962. Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 48, 1216-1222.

HUANG R.C., BONNER J., MURRAY K., 1964. Physical and biological properties of soluble nucleohistones. J. Mol. Biol., 8, 54.

HUANG R.C., BONNER J., 1965. Histone-bound RNA, a component of native nucleohistone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 54, 960-966.

INNOCENTI A.M., 1971. Cytophotometric determination of histone content in cell nuclei of proliferating and non proliferating root meristem cells of Triticum durum. Caryologia, 24, 4, 457-461.

IWAI K., 1964. Histones of rice embryos and of chlorella. In "The nucleohistones" (BONNER J., TS'O P.). Holden-day inc. San Francisco, 59-65.

JOHN P.C.L., NEIL JONES R., 1970. Molecular heterogeneity of soluble proteins and histones in relationships to the presence of B - chromosomes in rye. Exptl. Cell. Research, 63, 271-276.

JOHNS E.W., 1964. Studies on histones. VII - Preparative methods for histone fractions from calf thymus. Biochem. J., 92, 55-59.

JOHNS E.W., PHILLIPS D.M.P., SIMSON P., BUTLER J.A.V., 1960. Improved fractionations of arginine-rich histones from calf thymus. Biochem. J., 77, 631-636.

JOHNS E.W., PHILLIPS D.M.P., SIMSON P., BUTLER J.A.V., 1961. The electrophoresis of histones and histone fractions on starch gel. Biochem. J., 80, 189-193.

JOHNS E.W., BUTLER J.A.V., 1962 a. Further fractionations of histones from calf thymus. Biochem. J., 82, 15-18.

JOHNS E.W., BUTLER J.A.V., 1962 b. Studies on histones. IV - The histones of wheat germ. Biochem. J., 84, 436-439.

JOHNS E.W., FORRESTER S., 1970. Interactions between histone fractions and DNA. Biochim. Biophys. Acta, 209, 54-57.

JOHNS E.W., HOARE T.A., 1970. Histones and gene control. Nature, 226, 650-651.

JOHNSON L.D., DRIEDGER A., MARKO A.M., 1964. Chromatographic behaviour of histones on Sephadex and CMC. Can. J. of Biochem., 42, 795-811.

JOHNSTON F., STERN H., 1957. Mass isolation of viable embryos.Nature, 179, 160-161.

KIRK D., NEIL JONES R., 1970. Nuclear genetic activity in B - chromosomes rye, in term of the quantitative interrelationships between nuclear proteins, nuclear RNA and histone. Chromosoma (Berl.), 31, 241-254.

KOBAYASHI Y., IWAI K., ANDO T., 1963. Histones of rice embryos and of chlorella. Seikagaku J. Japan Biochem. Soc., 35, 81-87.

KONAREV V.G., 1970. Structure et activité fonctionnelle de la chromatine des végétaux (en russe). Kletochnoe Yadro Ego Ul'trastruktury Mater. Vses. Simp. "Strukt. Funkts. Kletochnogo Yadra", 2nd 1968 (pub. 1970), Zbarskii Nauka, Moscou, 28-33.

KONAREV V.G., SAKHAUTDINOVA S.M., BURAKAEVA B.K., 1965. Les histones des tissus végétau embryonnaires et différenciés (en russe). Dokl. Akad. Nauk. U.R.S.S., 160, 5, 1197-1199.

KONAREV V.G., GAVRILYUK I.P., YAMALEEVA A.A., 1972. Spécificité immunologique des fractions d'histone (en russe). Dokl. Akad. Nauk. U.R.S.S., 204, 4, 998-1001.

KONDO K., MORITA Y., 1954. Acides nucléiques dans la glutéline de riz (en japonais). Bull. Res. Inst. Food Sc. Kyoto Univ., 15, 1-17.

KOSSEL A., 1884. Über einen peptonartigen Bestandteil des Zellkerns. Z. Physiol. Chem., 8, 511-515.

LI HSUEH JEI, BONNER J., 1971. Interaction of histone half molecules with DNA. Biochemistry, 10, 8, 1461-1470.

LINDH N.O., BRANTMARK B.L., 1966. Preparation of basic proteins. In "Methods of biochemical analysis" (GLICK D.). Interscience Publishers. New-York, 14, 79-111.

LIPSHITZ R., CHARGAFF E., 1956. Studies on nucleoproteins. IV - Preparation of the DNP and fractionation of the DNA of wheat germ. Biochim. Biophys. Acta, 19, 256-2

LOEB J., 1966. Isolement des histones par précipitation des autres constituants de la chromatine avec le chlorure d'aluminium. C.R. Acad. Sci. Paris, 262, 2183-218

LOEB J., CREUZET C., 1970. Comparaison des propriétés électrophorétiques des protéines nucléaires de différents tissus Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 10, 1007-1020.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the FOLIN phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265.

LUCK J.M., KUPKE D.W., RHEIN A., HURD M., 1953. Non fibrous deoxypentose nucleohistone from liver. J. Biol. Chem., 205, 235-243.

LUCK J.M., RASMUSSEN P.S., SATAKE K., TSVETIKOV A.N., 1958. Further studies on the fractionation of calf thymus histone. J. Biol. Chem., 233, 1407-1414.

Mc ALLISTER H.C., WAN Y.C., IRVIN J.L., 1963. Electrophoresis of histones and histone fractions on polyacrylamide gels. Analyt. Biochem., 5, 321-329.

MACHEBOEUF M., DELSAL J., 1943. Sur le dosage de très petites quantités de phosphate dans les matières organiques. Bull. Soc. Chim. Biol., 25, 116-120.

MANDAL R.K., 1969. A comparison of histones from several different species. Indian J. Biochem., 6, 6-9.

MANDAL R.K., MONDAL H., SOM S., BISWAS B.B., 1971. Dissimilarity of plant and animal histones revealed by electrophoretic and immunological studies. Indian J. Biochem. Biophys., 8, 1, 50-51

MEJBAUM W., 1939. Uber die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in Derivaten der Adenylsaüre. Hoppe-Seyler's Zeischrift fur physiologische Chemie, 258, 117-120.

MIRSKY A.E., POLLISTER A.W., 1942. Properties of isolated chromosomes. Proc. natl. Acad. Sci. U.S., 28, 344.

MIRSKY A.E., POLLISTER A.W., 1946. Chromosomin, a deoxyribose nucleoprotein complex of the cell nucleus. J. Gen. Physiol., 30, 117-149.

MONDAL H., MANDAL R.K., BISWAS B.B., 1970. Nucleic acids in coconut water (milk). Plant Cell Physiol., 11, 1, 177-181

MOORE S., STEIN W.H., 1954. Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four per cent cross-linked sulfonated polystyrene resins. J. Biol. Chem., 211, 893-906.

MURRAY K., 1966. The acid extraction of histones from calf thymus deoxyribonucleoprotein. J. Mol. Biol., 15, 409-419.

MURRAY K., 1969. Stepwise removal of histones from native DNP by titration with acid at low temperature and some properties of the resulting partial nucleoproteins. J. Mol. Biol., 39, 125-144.

NAKAGAKI Y., HIRAI T., 1967. Fractionation of nuclear component from tobacco leaves and extraction of histones. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 33, 187-191.

NAZARENKO I.V., LADYGHINA M.E., 1970. Isolement de la fraction nucléaire des feuilles de tabac (en russe). Sel'skokh. Biol. 5, 6, 935-938.

NEELIN J.M., CONNEL G.E., 1959. Zone electrophoresis of chicken erythrocyte histone in starch gel. Biochim. Biophys. Acta, 31, 539-541.

NEELIN J.M., NEELIN E.M., 1960. Zone electrophoresis of calf thymus histone in starch gel. Can. J. Biochem. Physiol., 38, 355-363.

NETUPSKAYA S.V., PERUANSKII Y.V., KONAREV V.G., 1959. Détermination spectrophotométrique des acides nucléiques des végétaux d après les bases puriques (en russe). Biol. Nuklein Obmena u Rastenii, Ufa, Sbornik, 148-153.

OGUR M., ROSEN G., 1950. The nucleic acids of plant tissues. Arch. Biochem. Biophys., 25, 262-276.

OH Y.H., 1970. Spectroscopic studies of five purified histones from calf thymus. J. Biol. Chem., 245, 23, 6404-6416.

OLIVERA V.B.M., HUANG R.C., DAVISON N., 1964. Electrophoretische Untersuchungen an Nukleohistonen. Ber. Bunsenges. Physik. Chem., 68, 8-9, 802-805.

OSBORNE T.B., 1907. The proteins of the wheat kernel. Carnegie Institution of Washington. Pub n° 84

PALLOTTA D., BERLOWITZ L., 1970. Histones of two insect species. Biochim. Biophys. Acta, 200, 538-543.

PANYIM S., CHALKLEY R., 1969. The heterogeneity of histones. I - A quantitative analysis of calf histones in very long polyacrylamide gels. Arch. Biochem. Biophys., 130, 1-2, 337-346.

PANYIM S., BILEK D., CHALKLEY R., 1971. An electrophoretic comparison of vertebrates histones. J. Biol. Chem., 246, 13, 4206-4215.

PHILLIPS D.M.P., 1961. The histones. Progress in biophysics and biophysical chemistry. Pergamon Press, 211-280.

PHILLIPS D.M.P., JOHNS E.W., 1965. A fractionation of the histones of group $F_2a$ from calf thymus. Biochem. J., 94, 127-130.

PIERI J., VAUGIEN C., CAMUS G., 1968. Isolement et caractérisation de 4 fractions d'histone de Tetrahymena pyriformis. Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 7-8, 1253-1260.

RASMUSSEN P.S., MURRAY K., MURRAY J.M., 1962. On the complexity of calf thymus histone Biochemistry, 1, 79-89.

REISFELD R.A., LEWIS N.J., WILLIAMS D.E., 1962. Disc-electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature, 195, 281.

SAHAI SRIVASTANA B.I., 1968. Studies on the chromatine of barley leaves during senescence. Biochem. J., 110, 683-686.

SAHAI SRIVASTANA B.I., 1971. Relationships of histones to RNA synthesis in plant tissues. Physiol. Plant., 24, 27-33.

SAUTIERE P., TYROU D., MOSCHETTO Y., BISERTE G., 1971. Structure primaire de l'histone riche en glycine et en arginine isolée de la tumeur de chloroleucémie du rat. Biochimie, 53, 4, 479-483.

SCHNEIDER W.C., HOGEBOOM G.H., ROSS H.E., 1950. Distribution of nucleic acids and ATP in normal mouse liver and mouse hepatoma. J. Nat. Cancer Inst., 10, 977.

SHEPHERD G.R., NOLAND B.J., ROBERTS C.N., 1970. Phosphorus in histones. Biochim. Biophys. Acta, 199, 265-276.

SHERIDAN W.F., STERN H., 1967. Histones on meiosis. Exp. Cell. Research, 45, 323-335.

SIDOROVA V.V., 1970. Analyse immunochimique de la chromatine de blé (en russe). Sb. Tr. Aspir. Molodykh. Nauch. Sotrudnikov, Vses. Nauch.-Issled. Inst. Rasteniovod., 16, 98-100.

SIDOROVA V.V., GAVRILYUK I.P., KONAREV V.G., 1971. Analyse immunochimique de la chromatine des noyaux cellulaires végétaux (en russe). Fiziol. Rastenii, 18, 2, 380-386.

SKAKHOV A.A., KUZNETSOV E.D. 1972. Modifications de la teneur en histone pendant une stimulation de le biosynthèse par la lumière rouge (en russe). Elektron. Obrab. Mater., 3, 72-75.

SMITH E.L., DE LANGE R.J., BONNER J., 1970. Chemistry and biology of histones. Physiol. Reviews, 50, 2, 159-170.

SMITHIES O., 1955. Zone electrophoresis in starch gel: group variation in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J., 61, 629-641.

SONNENBERG P., ZUBAY G., 1966. Isolation of nucleohistone. Proced. Nucleic acids research, 600-614.

SONNENBICHLER J., NOBIS G., 1970. The so-called non-histones from acid treated calf thymus chromatine. Eur. J. Biochem., 16, 60-65.

SPELSBERG T.C., SARKISSIAN I.V., 1968. Isolation and electrophoresis of nucleoproteins of bean. Phytochemistry, 7, 2083-2088.

SPIKER S., CHALKLEY R., 1971. Electrophoretic analysis of histones from gibberelic acid-treated dwarf peas. Plant. Physiol., 47, 342-345.

STEDMAN E., STEDMAN E., 1950. Cell specificity of histones. Nature, 166, 780-781.

STEDMAN E., STEDMAN E., 1951. The basic proteins of cell nuclei. Phil. Trans. Roy. Soc. London, B, 235, 565-596.

STERN H., MIRSKY A.E., 1952. The isolation of wheat germ nuclei and some aspects of their glycolytic metabolism. J. Gen. Physiol., 36, 2, 181-200.

TERAOKA H., 1967. Proteins of wheat embryos in the period of vernalisation. Plant & Cell Physiol., 8, 87-95.

TERAOKA H., 1968. Histones of wheat embryos during the period of vernalisation. Plant & Cell Physiol., 9, 819-823.

THIVOLLE L.C.R., 1946. Cinétique de la phosphatase rénale. Réactions monomoléculaires et non monomoléculaires. C.R. Soc. Phys. Biol., 18, 171.

UI N., 1957. Preparations, fractionation and properties of calf thymus histone. Biochim. Biophys. Acta, 25, 493-502.

VAN DER WESTHUYZEN R., VON HOLT C., 1971. A new procedure for the isolation and fractionation of histones. F.E.B.S. Letters, 14, 5, 333-337.

VASIL'EVA N.A., GOFSHTEIN L.V., 1964. Méthode d'isolement des noyaux cellulaires de germes et de plantules de blé dans les solutions de glycérol (en russe). Dokl. Akad. Nauk. URSS, 157, 3, 696-698.

VASIL'EVA N.A., BELBINA G.G., TONGUR A.M., DAVTYAN Z., 1969. Etude comparative de la composition protéique des noyaux cellulaires d'embryons et de plantules de blé (en russe). Biokhimiya, 34, 6, 1239-1244.

VENDRELY R., GENTY N., COIRAULT Y., 1965. Etude comparée des histones d'érythrocytes chez diverses espèces animales. Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 12, 2233-2240.

VENDRELY R., VENDRELY C., 1966. Biochemistry of histones and protamines. Protoplasmatologia, 5, 3c, 1-88.

WEEKS D.P., MARCUS A.,1969. Polyribosome isolation in the presence of diethyl pyrocarbonate. Plant Physiol., 44, 9, 1291-1294.

WELSH R.S., 1960. Water soluble non fibrous deoxyribonucleoprotein from calf thymus nuclei. Nature, 187, 943-945.

WILHELM J.A., SPELSBERG T.C., HNILICA H.S., 1971. Nuclear proteins in genetic restriction. I - The histones. Sub-Cell. Biochem., 1, 39-65.

WOLFE F.H., KAY C.M., 1967. Physicochemical, chemical and biological studies on wheat embryo ribosomes. Biochemistry, 6, 2853-2861.

YAMADA Y., YASUDA T., 1971. Changes in the basicity of histone fractions during callus induction. Biochim. Biophys. Res. Communications, 43, 3, 488-493.

YAMALEEVA A.A., 1970. Fractionnement et identification des histones en liaison avec la phylogénie des blés (en russe). Sb. Tr. Aspir. Molodykh. Nauch. Sotrudnikov, Vses. Nauch.-Issled. Inst. Rasteniovod, 16, 106-111.

YAMALEEVA A.A., 1972. Analyse électrophorétique et immunologique des histones de Triticale (en russe). Bjull. Vses. Rasteniov. Vavilova, 21, 28-33.

YAMALEEVA A.A., GAVRILYUK I.P., KONAREV V.G., 1972. Analyse génomigue de Triticum aestivum et Triticale au moyen des histones (en russe). Genetika, 8, 8, 44-51.

ZAMPETTI-BOSSELER F., 1967. Isolement et caractérisation des histones des racines d'Allium cepa. Bull. Cl. Sci. Acad. Roy. Belg., 53, 10, 1189-1194.

ZUBAY G., DOTY P., 1959. The isolation and properties of DNP particles containing single nucleic acid molecules. J. Mol. Biol., 1, 1-20.

---

Vu et approuvé

Paris, le 26 juin 1973

Le Président de l'Université de Paris VI

A. HERPIN

Vu

et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET